

**Spontane zellvermittelte Zytotoxizität
im peripheren Blut des Hundes**

Brigitte Boenisch

Disbui. München
1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0048

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

SPONTANE ZELLVERMITTELTE ZYTOTOXIZITÄT
IM PERIPHEREN BLUT DES HUNDES

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Brigitte Boenisch

aus

Frontenhausen

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 24.Juli 1987

Meinen Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

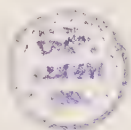
	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 <u>Spontane zellvermittelte Zytotoxizität</u>	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Effektorzellen	3
2.1.2.1 Natürliche Killerzellen (NK)	4
2.1.2.2 NK-ähnliche Zellen	8
2.1.2.3 Monozyten, Makrophagen	9
2.1.2.4 Neutrophile Granulozyten	11
2.1.2.5 Tierartliche Besonderheiten	12
2.1.3 Mechanismus der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität	14
2.1.4 Funktionelle Bedeutung und Regulation der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität	20
2.1.5 Testverfahren zum Nachweis und zur Messung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität	23
2.1.6 Möglichkeiten der Gewinnung und Charakter- isierung von Effektorzellen der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität	25

	Seite
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	32
3.1 <u>Material und Methoden</u>	32
3.1.1 Probanden	32
3.1.2 Blutentnahme	33
3.1.3 Gewinnung und Separation von Effektorzellen der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität aus dem peripheren Blut	33
3.1.3.1 Isolierung von mononukleären Leukozyten nach dem Ficoll-Dichtegradientenverfahren	33
3.1.3.2 Abtrennung adhärenter Zellen durch Inkubation auf Plastik	36
3.1.3.3 Abtrennung phagozytosefähiger Zellen mit Carbonyleisenpulver	37
3.1.3.4 Trennung von Lymphozyten über die Nylon- fasersäule	38
3.1.3.5 Diskontinuierlicher Percoll-Dichtegradient	39
3.1.4 Produktion zytotoxisch wirkender, löslicher Effektorzellprodukte	40
3.1.5 Messung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität	41
3.1.5.1 Effektorzellen und zytotoxische Überstände	42
3.1.5.2 Zielzellen	42
3.1.5.3 Chromium 51-Freisetzungstest	43

	Seite
3.1.6 Weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität beim Hund	46
3.1.6.1 Anti-asialo GM 1 Antikörper	46
3.1.6.2 L-Leucin Methylester	47
3.1.6.3 Morphologische und zytochemische Untersuchung der Effektorzellen	47
3.2 <u>Ergebnisse</u>	49
3.2.1 Vorversuche	49
3.2.1.1 Spezifität der Effektorzellen	49
3.2.1.2 Kinetik der Tumorzelllysis im Chromium 51- Freisetzungstest	51
3.2.1.3 Veränderung der effektorzellvermittelten Zytotoxizität durch in vitro-Kultur	54
3.2.2 Spontane zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) der separierten Effektorzellfraktionen	56
3.2.2.1 Übersichtsgraphik	56
3.2.2.2 SCMC der im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Effektorzellen	58
3.2.2.3 SCMC der Effektorzellen nach Inkubation auf Plastik	60
a) Nicht plastikadhärente Zellen	60
b) Leicht plastikadhärente Zellen	61
c) Stark plastikadhärente Zellen	61

3.2.2.4	SCMC der Effektorzellen nach Behandlung mit Carbonyleisenpulver	63
3.2.2.5	SCMC der Effektorzellen nach Inkubation auf Nylonfasersäule	64
	a) Nicht nylonadhärente Zellen	64
	b) Nylonadhärente Zellen	65
3.2.2.6	SCMC der im diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten isolierten Effektorzellen	67
3.2.3	Nachweis der Existenz und Wirksamkeit löslicher zytotoxischer Faktoren	69
3.2.3.1	Kinetik der Tumorzellysis durch zytotoxische Faktoren	69
3.2.3.2	Tumorzellzytotoxizität der produzierten Überstände	70
3.2.3.3	Korrelation zur effektorzellvermittelten Zytotoxizität	74
3.2.4	Weitere Charakterisierung der SCMC beim Hund	77
3.2.4.1	Reduktion der SCMC durch Effektorzellbehandlung mit dem anti-asialo GM 1 Antikörper	77
3.2.4.2	Reduktion der SCMC durch Effektorzellbehandlung mit L-Leucin Methylester	79
3.2.4.3	Zusammensetzung der Effektorzellfraktionen	81
	a) Peroxidasereaktion	81
	b) Lymphoide Zellen	83

	Seite
4. BESPRÉCHUNG DER ERGEBNISSE	87
5. ZUSAMMENFASSUNG	98
SUMMARY	100
6. ANHANG	102
7. LITERATURVERZEICHNIS	124
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	138



1. EINLEITUNG

Aus der Erkenntnis heraus, daß ein großer Teil der heute auftretenden Erkrankungen bei Mensch und Tier nicht monokausal, sondern multifaktoriell bedingt ist und angewandte Therapien infolgedessen nicht immer Erfolg hatten, konzentrierte sich die wissenschaftliche Forschung in den letzten Jahren wieder vermehrt auf die Erforschung erreger- und antigenunspezifischer Abwehrmechanismen.

Dies führte sogar zur Entstehung eines neuen Fachgebietes, der Paramunologie. Sie beschäftigt sich mit dem Phänomen der Paramunität (63,64,66,69,70,86), dem paraspezifischen Schutz von Individuen gegenüber einer Vielzahl von Schadwirkungen, der bereits wenige Stunden nach Auseinandersetzung des Organismus mit seiner keim- bzw. schadstoffhaltigen Umwelt einsetzt.

Die daran im Einzelnen beteiligten, synergistisch wirkenden Abwehrfunktionen sind außerordentlich komplex. Sie gehen einher mit gesteigerter Phagozytose-tätigkeit und einer Zunahme der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität sowie mit Lymphozytenproliferation und -aktivitätserhöhung. Neben diesen Änderungen auf zellulärer Ebene, trägt die Aktivierung humoraler antigenunspezifischer Faktoren und die Freisetzung von Lymphokinen und anderen Mediatoren zur Paramunisierung bei.

Das vorliegende Wissen über das Zusammenwirken zahlreicher verschiedener Abwehrmechanismen beim Zustandekommen einer Paramunität konnte für die Praxis bereits in Form von biologischen Paramunitätsinducern (11,65,67,71) nutzbar gemacht werden. Um

jedoch noch gezielter einzelne Abwehrfaktoren stimulieren zu können, ist weitere Grundlagenforschung auf diesem Gebiet unabdingbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine der funktionellen Grundlagen der Paramunität, die spontane zellvermittelte Zytotoxizität, für die Spezies Hund näher zu untersuchen. Ausgangsmaterial ist peripheres Hundeblut, aus dem die spontan zytotoxischen Effektorzellen isoliert und charakterisiert werden sollen. Daneben wird versucht, das bestehende hypothetische Modell zum Mechanismus der Zytolyse durch humane und murine Effektorzellen auf seine Anwendbarkeit beim Hund hin zu überprüfen.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Spontane zellvermittelte Zytotoxizität

2.1.1 Definition

Die spontane zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) stellt einen wichtigen antigenunspezifischen Abwehrmechanismus dar, über den sowohl Vertebraten als auch Avertebraten verfügen (87). Dieser ermöglicht es dem Organismus, eine Vielzahl körperfremder aber auch körpereigener, virusinfizierter oder transformierter Zellen ohne vorherige Sensibilisierung direkt zu lysieren. Für die SCMC besteht keine Restriktion durch Produkte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), durch Organ- oder Speziesbarrieren; es können syngene Zielzellen gleichermaßen wie allogene oder xenogene lysiert werden.

Verantwortlich für die SCMC sind verschiedene Arten von Effektorzellen, die beim Kontakt mit der entsprechenden Zielzelle aktiviert werden und meist unspezifisch wirkende, lösliche Mediatoren freisetzen. Diesen Zytokinen wird eine gewichtige Rolle an der nachfolgenden Zielzelllysis zugesprochen (31). Den Effektorzellen der SCMC fehlt ein "immunologisches Gedächtnis", wie es bei antigenspezifisch reagierenden B- und T-Lymphozyten bekannt ist.

2.1.2 Effektorzellen

Als Effektorzellen der SCMC im weiteren Sinne gelten alle Zellen mit der Fähigkeit zur spontanen, nicht-MHC-restringier-

ten Zielzelllysis. Seit Entdeckung der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) im Jahre 1975 (44) jedoch, wird die SCMC zumeist mit NK-Zellaktivität gleichgesetzt. Da bisher nicht eindeutig geklärt ist, in welchem Maße andersgeartete Effektorzellen zur SCMC beitragen, werden im folgenden alle Zellarten besprochen, deren Beteiligung an diesem unspezifischen Abwehrmechanismus diskutiert wird bzw. nachgewiesen ist (s. auch 2.1.6., Tab. 1). Hierbei beziehen sich die Informationen zunächst ausschließlich auf humane und murine Effektorzellen, da für diese Spezies die bei weitem umfangreichsten Forschungsergebnisse vorliegen. Auf tierartliche Besonderheiten wird am Ende dieses Kapitels kurz eingegangen (s. 2.1.2.5).

2.1.2.1 Natürliche Killerzellen (NK)

Definition

Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) machen etwa 2-6% der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus. Sie können weder als Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen identifiziert werden, noch sind sie eindeutig den B- oder T-Zellen zuzuordnen. Die Abgrenzung gegenüber ersteren geschieht vor allem über funktionelle und morphologische Unterschiede: NK-Zellen besitzen nicht die Fähigkeit zur Phagozytose und Oberflächenadhäsion, und stellen sich als lymphoide Zellen dar. Dies rechtfertigt ihre Zuteilung zur autonomen 3. Lymphozytengeneration (85).

NK-Zellen können eine Vielzahl von empfänglichen syngenen, allogenen und xenogenen Zellen ohne vorherige antigenspezifische Stimulation lysieren. Die zytotoxische Aktivität ist

nicht durch Haupthistokompatibilitätsantigene eingeschränkt, ein "immunologisches Gedächtnis" scheint zu fehlen. Diese Eigenschaften ermöglichen eine deutliche Trennung zwischen NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Als Zielzellen der NK-Aktivität im Experiment fungieren unterschiedlichste Tumorzellen, eine Reihe normaler Zellarten oder Zelllinien insbesondere nach Virusinfektion, embryonale Zellen sowie Subpopulationen von Makrophagen, Knochenmarks- und Thymuszellen (77).

Morphologie

Schon wenige Jahre nach Entdeckung der NK-Zellen konnte ihre Morphologie aufgeklärt werden (99,101). Es wurde der Nachweis erbracht, daß eine Zellpopulation großer granulierter Lymphozyten (LGL) eng mit dem Phänomen der NK-Aktivität verbunden war. Sie fungierten als Effektorzellen und wurden der bis dahin als NK-Zellen bezeichneten Zellart praktisch gleichgesetzt. Die LGL entsprechen in ihrer Größe in etwa Monozyten (16-20 μm), haben nierenförmige Kerne und weisen ein für Lymphozyten hohes Verhältnis zwischen Zytoplasma und Kernvolumen auf. Sie zeichnen sich weiterhin durch eine auffällige azurophile Granulierung ihres Zytoplasmas aus.

Die Verteilung der LGL in den einzelnen Körperorganen korreliert in etwa mit der jeweils meßbaren NK-Aktivität. Sowohl die Zahl der LGL als auch die NK-Aktivität sind im peripheren Blut und im Dünndarmepithel am höchsten; danach folgen für die meisten Spezies in noch nicht genau bekannter Reihenfolge Milz, Leber, Knochenmark, Lymphknoten, Ductus thoracicus, Peritoneal-

höhle und Lunge. Keinerlei NK-Aktivität läßt sich in Thymus und Tonsillen feststellen.

Auch die Zelloberfläche der NK-Zellen wurde in den letzten Jahren näher charakterisiert (1,77). Man konnte weder Immunglobuline (Ig) noch Rezeptoren für die 3. Komplementkomponente entdecken. Stattdessen fanden sich Rezeptoren für alpha-, beta- und gamma-Interferon, für Interleukin 2, für Schafer erythrozyten und für das Fc-Fragment von IgG auf den Zelloberflächenmembranen. Darüberhinaus exprimieren die LGL Zelloberflächenantigene, die sonst nur auf T-Lymphozyten, Monozyten (Makrophagen) oder Granulozyten vorkommen und für die jeweilige Zellart charakteristisch sind (85).

Die Erforschung der Zelloberflächen brachte das Ergebnis, daß es sich bei den NK-Zellen um eine heterogene Zellpopulation handelt mit wechselnden Oberflächenmarkern und unterschiedlicher Zielzellspezifität. Des weiteren besaß zwar der überwiegende Teil an NK-Zellen LGL-Morphologie, doch waren auch andere lymphoide Zellen mit NK-Eigenschaften anzutreffen. HERBERMAN führt diese Heterogenität auf die Tatsache zurück, daß sich die NK-Zellen in wechselnden Phasen der Ausdifferenzierung befinden und deshalb auf stimulierende Reize auf unterschiedlichste Weise reagieren (77).

Abstammung

Die Herkunft der NK-Zellen konnte bisher nur teilweise geklärt werden. Als gesichert gilt, daß die NK-Zellen dem Knochenmark entstammen (24) und ihre Ausdifferenzierung thymusunabhängig verläuft (31). Ihre Halbwertszeit im Blut beträgt höchstens 5

Tage (23).

Jüngste Forschungsergebnisse (23,37) untermauern die Hypothese einer gemeinsamen Vorläuferzelle von NK- und T-Zellen, die durch verschiedene endogene und exogene Stimuli bzw. Suppressionen zur endgültigen Ausdifferenzierung veranlaßt wird. Die Argumente für eine Abstammung der NK-Zellen von der myelomonocytyären Zellreihe oder direkt von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark scheinen damit im Augenblick weitgehend entkräftet.

Funktion

Neben der wichtigen Aufgabe als zelluläre Hauptträger der SCMC kommen den NK-Zellen auch sekretorische Funktionen zu. Sie sezernieren eine Reihe von Lymphokinen (78,89), darunter Interleukin 1 und Interleukin 2, alpha- und gamma-Interferon, "colony stimulating factor" (CSF), einen B-Zellwachstumsfaktor (BCGF), "natural killer cytotoxic factor" (NKCF), "tumor necrosis factor" (TNF), Lymphotoxin (LT) und Leukoregulin (LRG). Dies weist stark darauf hin, daß NK-Zellen noch andere wichtige immunregulatorische Funktionen im Organismus innehaben (89). Eine weitere mit der Fraktion der LGL assoziierte Aktivität ist die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) (101). Sie kommt durch Bindung der Fc-Rezeptoren auf der LGL-Oberfläche an antikörperbeladene Zielzellen zustande. Die ursprünglich als "Killerzelle" (K-Zelle) bezeichnete Effektorzelle der ADCC wurde somit als LGL identifiziert und man geht davon aus, daß diese eine Zellart beide Arten von Zytotoxizität vermitteln kann.

2.1.2.2 NK-ähnliche Zellen

Versuche mit in Zellkultur am Leben erhaltenen und auf unterschiedlichste Weise stimulierten Lymphozyten aus dem peripheren Blut zeigten, daß primär nicht zytotoxische Zellen nach mehrtägiger Inkubation bei 37°C plötzlich spontane Zytotoxizität entfalten (77). Diese richtet sich gegen eine Vielzahl von Zielzellen, darunter auch NK-resistente, die sowohl in vivo als auch in vitro ohne vorherige Immunisierung oder Einschränkung durch den MHC lysiert werden. Die selektive Zytotoxizität gegenüber NK-sensiblen Zielzellen bleibt erhalten, gleichzeitig besitzen die erzeugten Effektorzellen LGL-Morphologie. Deshalb bezeichnete man sie als NK-ähnliche Zellen. Als Stimuli für die kultivierten Zellen dienen Lektine, FKS, allogene Zellen und vor allem IL 2, der bisher einzige, klar definierte Wachstumsfaktor für NK-Zellen. Weitere Lymphokine, darunter ein säurelabiler Faktor, der weder durch gamma-IFN noch durch IL 2 ersetzt werden konnte, sollen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (95).

Je nach verwendetem Stimulus nennt man die entstandenen zytotoxischen Effektorzellen auch Lektinaktivierte- bzw. Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK).

Zur Entstehung neuer, NK-ähnlicher Aktivität kommt es auch dann, wenn vorhandene LGL vor Etablierung und Stimulierung der Zellkultur entfernt werden.

Die Zelloberflächenantigene NK-ähnlicher Zellen sind kein beständiges Merkmal, sondern unterliegen während der Kultivierung laufenden Veränderungen. Die Ursache für die

Heterogenität der neu entstandenen Zellklone konnte noch nicht ermittelt werden (77).

Auch die Bedeutung in vitro erzeugter, NK-ähnlicher Zellen für die Aktivierung unspezifischer, zellulärer Abwehrmechanismen wird erst in den nächsten Jahren abzuschätzen sein.

2.1.2.3 Monozyten, Makrophagen

Die Zellen des mononukleär-phagozytären Systems erfüllen vielseitige Aufgaben im Organismus und finden sich im ganzen Körper. Ihre augenfälligste Eigenschaft besteht in der Fähigkeit zur Phagozytose vieler Antigene. Unterstützt wird die Phagozytose durch Sekretion von Enzymen aus peroxidasehaltigen, zytoplasmatischen Lysosomen und durch Synthese von verschiedenen, mikrobizid wirkenden Sauerstoffverbindungen. Darüberhinaus werden Enzyme und Mediatoren sezerniert, die die Proliferation, Differenzierung und Funktion anderer Immunzellen regulieren. Eine weitere wichtige Aufgabe beim Zustandekommen der zellulären Immunantwort ist die Antigenpräsentation in Verbindung mit Produkten des MHC auf der Makrophagenzelloberfläche. Neben diesen vielfältigen Funktionen wird den Monozyten und Makrophagen eine Rolle bei der Tumorzellabwehr zugesprochen (96).

Die Entwicklung der Makrophagen nimmt ihren Ursprung aus einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark, aus der sich über verschiedene Zwischenstufen schließlich Promonozyten bilden. Nach einer weiteren Teilung im Knochenmark werden sie als Monozyten ins Blut abgegeben. Sie verbleiben etwa 70 Stunden im Blutkreislauf, wandern dann als reife Monozyten in die ver-

schiedenen Gewebe und Organe ein und werden zu beweglichen Makrophagen. Dort leben sie bis zu 40 Tagen. Die relativ großen (16-20 μm), zytoplasmareichen Zellen sind oberflächenadhäsiv und haben einige Zelloberflächenantigene gemeinsam sowie einen Rezeptor für die 3. Komplementkomponente. Lymphokinrezeptoren werden vermutet, konnten allerdings bisher nur für gamma-IFN nachgewiesen werden (96).

Über einen Fc-Rezeptor auf ihrer Oberfläche sind Makrophagen in der Lage ADCC zu vermitteln. Daneben existiert eine antikörper-unabhängige Form makrophagenvermittelter Zytotoxizität, über die neoplastische Zellen selektiv lysiert werden (95).

Die Entdeckung der NK-Zellen löste in Fachkreisen heftige Diskussionen aus über den tatsächlichen Anteil von Monozyten und Makrophagen an der SCMC gegen Tumoren. Während die eine Seite eine Beteiligung mononukleärer Phagozyten an der spontanen Tumorzelllysis nachwies (19,34,43,62,105), führte die andere Seite die gemessene Zytotoxizität auf Kontamination der adherenten Zellen mit NK-Zellen zurück, die man für die Lysis der Tumorzellen verantwortlich machte (15,20).

Der gegenwärtige Stand der Wissenschaft deutet darauf hin, daß frisch aus dem Blut isolierte Monozyten für Tumorzellen nicht spontan lytisch sind, sich aber nach Kultivierung und Reifung bei gleichzeitiger Aktivierung in potente Effektorzellen der SCMC entwickeln (95). Hierzu muß der normale Gewebsmakrophage zwei Aktivierungsphasen durchlaufen, der frisch aus dem Blut ins Gewebe abgewanderte bzw. an einer Entzündung o.ä. beteiligte jedoch nur eine einzige. Die Aktivierung geschieht in

vivo direkt über Lymphokine oder nach exogener Stimulation des Körpers mit sogenannten Biological Response Modifiers mikrobieller Herkunft (z.B. MDP, LPS (73)) durch verschiedene andere Mediatoren sowie Regulatoren des Entzündungsgeschehens. Dabei dürfte dem körpereigenen alpha- und gamma-IFN zusammen mit dem "macrophage activation factor" (MAF) die überragende Bedeutung zukommen (95). In vitro werden die mononukleären Phagozyten meist durch die Methoden der Isolierung (s.2.1.6) und durch die verwendeten Kulturmedien in einen aktivierten Zustand versetzt (85).

2.1.2.4 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten üben in erster Linie eine antimikrobielle Funktion im Organismus aus. Sie erreichen diese Funktion durch Kombination von Phagozytose und Abtötung der Mikroorganismen durch sezernierte Sauerstoffmetaboliten und gewebesabbauende Enzyme. Des weiteren werden neutrophile Granulozyten als Effektorzellen der SCMC in Erwägung gezogen (27,31). Die neutrophilen Granulozyten stellen einen Anteil von 60-70% der gesamten Leukozytenfraktion im Blut und stammen von einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark ab. Nach Durchlaufen verschiedener Differenzierungsstufen, die durch mehrere Zellteilungen hindurch denen der Monozyten entsprechen, werden die neutrophilen, segmentkernigen Granulozyten ins Blut abgegeben. Dort beträgt ihre Halbwertszeit 6-20 Stunden, danach leben die Zellen noch 1-2 Tage extrazellulär im Gewebe.

Die neutrophilen Granulozyten sind 12-18 µm groß, oberflächen-

adhäsiv und besitzen primäre azurophile und sekundäre neutrophile, sekretorische Granula in ihrem Zytoplasma. Da sie auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für die 3. Komplementkomponente und für das Fc-Fragment des IgG tragen, können sie ADCC vermitteln und auf diese Weise auch Tumorzellen lysieren (41). Neben diesem antikörperabhängigen Mechanismus wurde jedoch auch eine granulozytenvermittelte Zytotoxizität ohne vorherige antigenspezifische Sensibilisierung oder Einschränkung durch MHC-Antigene beobachtet (16,27,31,41,46,105). Die Autoren berichteten bei in vitro-Versuchen sowohl eine Ablösung adhärenz wachsender Tumorzellen mit nachfolgender Zytolyse durch die Granulozyten (15,105) als auch eine Zytostase (27,46). Diese resultiert nach Aktivierung der Effektorzellen u.U. in einer Zytolyse (27). Ebenso wie die NK-Zellen und Makrophagen zeigen die Granulozyten Zielzellspezifität, wobei maligne Zellen deutlich bevorzugt werden (31). Welche Rolle Granulozyten als spontan zytotoxische Zellen in vivo spielen, ist im Augenblick noch Gegenstand von Spekulationen (41).

2.1.2.5 Tierartliche Besonderheiten

Bisher wurde bei allen untersuchten Säugetierarten (Maus, Ratte, Hamster, Meerschweinchen, Nerz, Katze, Tiger, Hund, Schwein, Rind, Pferd und Primaten) eine SCMC nachgewiesen (55,87). Diese richtet sich gegen allogene und xenogene Zielzellen, wobei maligne oder virusinfizierte Zellen bevorzugt lysiert werden. Bei den meisten Tierarten konnte ein "large granular lymphocyte" (LGL)-Zelltyp identifiziert werden.

Die höchste NK-Aktivität konnte, sofern verschiedene Körperkompartimente untersucht wurden, im peripheren Blut und im Dünndarmepithel (14,59,87) gemessen werden. In den Fällen, in denen der LGL-Zelltyp näher charakterisiert wurde, ergaben sich ähnliche, wenn nicht dieselben Eigenschaften wie für die humane NK-Zelle (s. 2.1.2.1) (87).

Beim Rind allerdings konnten BIELEFELDT OHMANN et al. (2) eine starke Beteiligung mononukleärer Phagozyten an der SCMC nachweisen.

Nk-Aktivität beim Hund

Die vorliegenden Informationen zur SCMC des Hundes beziehen sich ausschließlich auf die NK-Aktivität (51,57,83,84,87). Die canine NK-Zelle wird als nicht oberflächenadhärent, nicht nylonadhärent und nicht phagozytierend beschrieben (87). Auf ihrer Oberfläche konnten bei ca. 40% der Zellen Rezeptoren für das Fc-Fragment von IgG entdeckt werden, jedoch keine Immunglobuline (84). Für annähernd alle NK-Zellen gelang der Nachweis eines caninen T-Zellmarkers (Thy-1). LOUGHRAN et al. (57) untermauerten die Hypothese der T-Zellabstammung der caninen NK-Zelle durch Einsatz monoklonaler Antikörper gegen die verschiedenen Hundeleukozyten. So konnte er die von ihm angereicherten und morphologisch charakterisierten LGL der T-Zellreihe zuordnen. Von den getesteten Zielzellen wurden zwar allogene und xenogene Zellen geringgradig lysiert, doch wurde die höchste Zytotoxizität bei allogenen Tumorzellen bzw. virusinfizierten Körperzellen (Morbillivirus) gemessen (83,94). Die SCMC folgte dabei einer Dosis-Wirkungs-Beziehung, wobei die

Höhe der gemessenen Zielzelllysis der Menge der Effektorzellen direkt proportional war. Bei einem Effektor-Zielzellenverhältnis von 80:1 konnte allerdings ein Sättigungsgrad beobachtet werden, über den hinaus keine weitere Erhöhung der Zytotoxizität durch Zugabe von Effektorzellen mehr möglich war (57).

Eine NK-Aktivität wurde bereits bei 1-wöchigen Hunden nachgewiesen, ebenso bei gnotobiotisch gehaltenen Tieren. Es bestanden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (83).

Von den untersuchten Kompartimenten war die unmittelbar ex vivo bestimmte NK-Aktivität im peripheren Blut am höchsten, nahm in der Milz um etwa zwei Drittel ab und reduzierte sich im Knochenmark noch einmal um die Hälfte (57).

RINGLER und KRAKOWKA (84) bemerkten eine Reduktion der NK-Aktivität nach Depletion der phagozytierenden Zellen und erklärten dieses Phänomen mit einem Absinken des Interferonspiegels nach dem Wegfall der Makrophagen.

2.1.3 Mechanismus der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität

Die Eliminierung schädlicher oder geschädigter Zellen aus dem Organismus erreichen die verschiedenen Effektorzellen der SCMC vermutlich über einen sehr ähnlichen Mechanismus. Dieser setzt die Bindung der Effektorzellen an die Zielzellen über spezifische Rezeptoren voraus. Der nächste Schritt besteht in der Aktivierung der Effektorzellen, der sie in die Bereitschaft zur Zielzelllysis versetzt. Darauf folgt dann die effektorzellunabhängige Schädigung der Zielzellen (6). Man nimmt derzeit an, daß bei allen bekannten Effektorzellarten lösliche Faktoren den

zytotoxischen Effekt vermitteln (118). Dies führte zur Entwicklung des sogenannten Stimulus-Sekretions-Modells, demzufolge die Effektorzellen nach Bindung an die jeweilige Zielzelle zytotoxische Moleküle freisetzen (s. Abb. 1) (5).

Folgende Proteine mit zytostatischer oder zytolytischer Aktivität gegen verschiedene Tumorzellarten in vitro und in vivo konnten bisher isoliert werden:

a) Natural killer cell cytotoxic factor (NKCF)

Dieser Faktor wird von NK-Zellen nach Stimulation mit NK-empfindlichen Zielzellen oder Lektinen gebildet. Die Freisetzung des NKCF geschieht über einen Zeitraum, der mit der Dauer der NK-zellvermittelten Zytotoxizität in etwa übereinstimmt. Tumorzellen, die vom NKCF lysiert werden, sind in der Regel auch für NK-Zellen lysierbar (22). Der NKCF scheint der wichtigste zytotoxische Faktor bei der Vermittlung der NK-Aktivität zu sein, da andere durch LGL gebildete Faktoren (TNF, LT) nur unwesentlich zur Lysis NK-sensibler Zielzellen mit beitragen (78,80).

b) Perforin (Cytolysin)

Perforin wurde aus den sekretorischen Granula von CTL und LGL, d.h. NK-Zellen isoliert und konnte bisher bei Mensch, Maus und Ratte nachgewiesen werden. In den Granula sind zytotoxische Vorläufermoleküle (Perforine) gespeichert, die nach Freisetzung in den Intrazellulärspalt in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen polymerisieren (Polyperforine) und auf den Zielzellmembranen tubuläre Läsionen setzen. Durch diese Kanalbildung kommt es zur Durchlässigkeit von Ionen, Wasser und

Makromolekülen durch die Zellmembran, was in Folge die Vernichtung der Zielzelle nach sich zieht. Die Art der Läsionen sowie eine bestehende immunchemische Verwandtschaft läßt auf einen gemeinsamen Ursprung von Perforin und der 9. Komplementkomponente schließen (6,113,115). Es konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Perforinen und der NK-zellvermittelten Zytotoxizität besteht (6).

c) Lymphotoxin (LT)

Lymphotoxin wird von antigen- oder mitogenstimulierten Lymphozyten und von LGL gebildet. Es existieren verschiedene Klassen von LT mit unterschiedlichen Molekulargewichten, die jeweils unterschiedliche Tumorzellen, darunter NK-sensible sowie auch einige "normale" Zellen in vitro lysieren (78,111).

d) Leukoregulin (LRG)

Leukoregulin besitzt zytostatische Aktivität gegenüber einer weit größeren Zahl von Tumorzellen als die anderen bekannten zytotoxischen Faktoren. Zur Sekretion des Proteins kommt es nach Stimulation von LGL mit NK-sensiblen Tumorzellen (78).

e) Tumor necrosis factor (TNF)

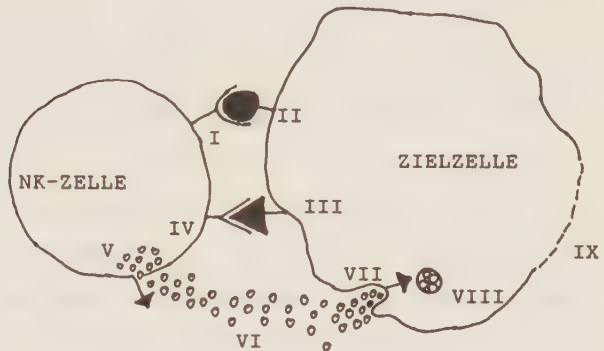
Der Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) wird von aktivierten Makrophagen gebildet und gilt als Mediator der zytokinstimulierten, makrophagenvermittelten Zytotoxizität. Er hat auf Tumorzellen in vivo wie in vitro nekrotisierende Wirkung, wobei nur Zielzellen geschädigt werden, für die auch aktivierte Makrophagen zytotoxisch sind (91,103).

Ein dem TNF- α sehr ähnlicher zytotoxischer Faktor, der Tumor necrosis factor beta (TNF- β), wird von B-Zellen freigesetzt. Auch er inhibiert bzw. lysiert selektiv makrophagen-sensible Tumorzellen (91,103). Seit kurzem ist bekannt, daß durch Stimulation mit NK-sensiblen Tumorzellen oder Lektinen LGL ebenfalls zur Freisetzung niedriger Mengen von TNF- α angeregt werden, die jedoch nur einen geringen Anteil an der NK-zellvermittelten Zytotoxizität zu haben scheinen (80). Heute weiß man auch, daß die lange Zeit beschriebenen "natural cytotoxic cells" (NC) (97) keine weitere Effektorzellart der SCMC darstellen, sondern die NC-Aktivität lediglich auf TNF-Freisetzung zurückzuführen ist (75,79).

Die genannten zytotoxischen Faktoren konnten über monoklonale Antikörper und unterschiedliche Zielzellspezifität sicher voneinander getrennt werden (78). Man geht davon aus, daß neben diesen auch bisher noch unbekannten Faktoren sowie lysosomalen Enzymen und Sauerstoffradikalen eine Bedeutung beim Mechanismus der SCMC zukommt. Bei aktivierten Makrophagen konnte nach Bindung an Tumorzellen über entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche spontane Freisetzung von zytolytischer Protease (CP) beobachtet werden, der neben TNF- α eine wichtige Rolle bei der Zielzelllysis zugesprochen wird (96). Daneben sind sowohl oxidative als auch nicht oxidative Mechanismen an der von phagozytierenden Zellen vermittelten Zytotoxizität beteiligt (96,105). Lysosomale Enzyme scheinen zumindest zytostatische Wirkung auf die gebundenen Tumorzellen zu haben (96).

Abbildung 1 zeigt grobschematisch das aktuelle Modell zum Mechanismus der NK-zellvermittelten Zytotoxizität. Ob dabei Cytolysin die Zielzelle für NKCF und andere zytotoxische Faktoren zugänglich macht oder ob es für sich alleine bereits zytolytisch wirkt, bleibt noch zu klären (29).

Abbildung 1: Hypothetisches Modell zum Mechanismus der NK-zellvermittelten Zytotoxizität (nach Bonavida und Wright (5))



Einzelschritte bei der NK-Zielzellinteraktion:

1. Bindung von Erkennungsstrukturen auf der NK-Zelloberfläche (I) an Rezeptoren auf der Zielzelle (II) (Mg^{2+} -abhängiger Schritt).
2. Ein weiterer Zielzellrezeptor (III) aktiviert die NK-Zelle durch Bindung an einen passenden Rezeptor (IV) (Ca^{2+} -abhängiger Schritt).
3. Daraufhin Neuorientierung der zytoplasmatischen Organellen in Richtung Zielzelle und Freisetzung von NKCF (V, VI).
4. Über NKCF-Bindungsstellen (VII) Aufnahme des zytotoxischen Faktors in die Zielzelle (VIII) mit nachfolgendem Zelltod (IX).

2.1.4 Funktionelle Bedeutung und Regulation der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität

Funktionelle Bedeutung

Die Effektorzellen der SCMC erfüllen die wichtige Aufgabe der Tumorabwehr im Organismus noch bevor zelluläre und humorale Mechanismen spezifisch auf tumorassoziierte und/oder tumorspezifische Antigene reagieren können.

In den tumorös veränderten Gewebsbezirken sind sie gehäuft anzutreffen und tragen so zur verminderten Ausbreitung von Metastasen bei (31). Empfängliche Tumorzellen werden in der frühen Phase des Tumorwachstums innerhalb von 1-2 Tagen eliminiert (21), während z.B. auf etablierte Karzinome kein Einfluß mehr besteht (85). Darüberhinaus trägt die SCMC wesentlich zur Elimination virusinfizierter Körperzellen (82,106) und zur Kontrolle mikrobieller (82) und parasitärer (31) Infektionen bei.

Für die Abstoßung transplantierten Knochenmarks werden unter anderem NK-Zellen verantwortlich gemacht, ebenso für das Auftreten von Graft-versus-Host-Reaktionen nach Gewebetransplantationen (82).

Da Makrophagen und NK-Zellen außerdem eine Vielzahl von Zytokinen sezernieren, wird ihnen ein entscheidender Einfluß bei der Immunregulation und Hämoipoese zugesprochen (82).

Regulation

Seitdem eine eindeutige Korrelation zwischen verminderter NK-Aktivität und erhöhter Malignomrate nachgewiesen werden konnte (31), steht die Frage nach Wegen der Stimulation der SCMC vor

allem im Hinblick auf mögliche Therapieformen im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses.

Die Erkenntnis, daß alle bekannten Interferonarten (alpha-, beta- und gamma-IFN) entscheidend an der Erhöhung der SCMC beteiligt sind, lenkte die Aufmerksamkeit auf die zahlreichen Immunmodulatoren und deren positive wie negative Wirkung auf die Effektorzellen (30,58).

Eine Aktivitätssteigerung der SCMC in vivo und in vitro kann insbesondere durch folgende Zytokine erreicht werden:

- Interferone (IFN) führen zu einer Erhöhung der NK-Aktivität (alpha-, beta- u. gamma-IFN), indem sie nicht zytolytische Vorläuferzellen in einen aktiv-lytischen Zustand versetzen und gleichzeitig bereits aktive NK-Zellen noch mehr anregen (85). Daneben steigern sie die makrophagenvermittelte Zytotoxizität (alpha-, gamma-IFN) in erster Linie durch Aktivierung und Verstärkung der Effektor-Zielzellbindung (73,96).
- Interleukin 2 (IL 2) wurde zunächst als Wachstumsfaktor für in vitro kultivierte LGL identifiziert (21), hat jedoch auch in vivo potente stimulierende Wirkung auf NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen (30).
- Interleukin 1 (IL 1) ist ebenso in der Lage, die durch Makrophagen und NK-Zellen vermittelte SCMC anzuheben.
- TNF und MAF haben direkte aktivierende Wirkung auf Monozyten/Makrophagen (81,96).

Die aufgelisteten Zytokine werden größtenteils von den Effektorzellen der SCMC selbst oder von nicht zytotoxischen Helferzellen mit LGL-Morphologie gebildet. So unterliegen sie zusätzlich einer positiven Selbstregulation ihrer zytotoxischen Aktivität (89). Aus der Vielzahl getesteter Immunmodulatoren soll hier lediglich die stimulierende Wirkung synthetischer und biologischer (10,61) IFN-Inducer auf die SCMC nach in vivo-Behandlung erwähnt sein.

Neben stimulierenden wirken auch suppressive Einflüsse auf die SCMC. Hier stehen vor allem Suppressorzellen im Mittelpunkt, die sowohl aus gesunden als auch aus erkrankten Organismen isoliert werden können (56). Es handelt sich um eine heterogene Population, bestehend aus Makrophagen, T-Zellen, Granulozyten (56) sowie Zellen mit LGL-Phänotyp (60). Daneben scheinen noch nicht identifizierte Suppressorzellen zu existieren (56).

Weiterhin ist bekannt, daß von Tumorzellen und Suppressormakrophagen gebildete Prostaglandine die Zielzelllysis durch direkte Wirkung auf die Effektorzellen der SCMC stark inhibieren (85). Auch von einer Reihe biologischer Agentien und Chemikalien ist eine negative Wirkung auf die SCMC bekannt (77), wobei die inhibitorischen Effekte in der Regel auf die Induktionsphase von Suppressorzellen zurückzuführen sind (17).

Ob Immunmodulatoren und andere Stoffe positiv oder negativ regulierend auf die Effektorzellen der SCMC und hierbei vor allem auf die NK-Zellen einwirken, ist oft von der Art der Verabreichung einer Testsubstanz und dem Zeitpunkt der Messung

der SCMC abhängig (17).

Dies zeigt, daß die SCMC einer komplexen Immunregulation unterliegt, deren vollständige Aufklärung noch aussteht.

2.1.5 Testverfahren zum Nachweis und zur Messung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität

Mitte der sechziger Jahre begannen verschiedene Forschergruppen, sich mit der spezifischen zellvermittelten Zytotoxizität gegen tumorassoziierte Antigene zu beschäftigen. Es wurden zahlreiche Testsysteme zum Nachweis und zur Messung zytotoxischer Effekte auf Zielzellen entwickelt (26). Zunächst verfolgte man das Schicksal der Zielzelle anhand mühsamer, mikroskopischer Beobachtung und Zellzählung (108), wobei nach Inkubation der Effektorzellen mit den Tumorzellen die Anzahl überlebender Zellen bzw. die Abnahme kolonienbildender Tumorzellen bestimmt wurde (8,25,33).

Im Jahre 1968 entwickelten BRUNNER et al. (9) einen einfachen, hoch empfindlichen Test zum Nachweis für zelluläre Zytotoxizität, der bis heute das am häufigsten angewandte Testverfahren zur Messung der SCMC ist. Das Verfahren beruht auf der Freisetzung von radioaktivem Chromium 51 (^{51}Cr) aus vorher markierten Zielzellen nach Inkubation mit einer definierten Zahl an Effektorzellen. So kann aus der Höhe der freigesetzten Radioaktivität der prozentuale Anteil lysierter Zielzellen direkt berechnet werden. Neben dem ^{51}Cr -Freisetzungstest existieren andere Möglichkeiten radioaktiver Zielzellmarkierung. LEIBOLD und BRIDGE (54) beispielsweise verwendeten ^{75}Se -Methio-

nin für ihre Zytotoxizitätsmessungen an Effektorzellen verschiedener Tierarten. Am Prinzip des Inkorporations-Freisetzungstests ändert sich durch Einsatz verschiedener Radioisotope nichts. Ausschlaggebend für die Anwendbarkeit des Verfahrens ist in erster Linie die radioaktive Markierbarkeit der verwendeten Zielzelle (9).

Da dem ^{51}Cr -Freisetzungstest vor allem der Nachteil des Arbeitens mit radioaktiven Materialien einschließlich aller Folgeprobleme anhaftet, wurde in den vergangenen Jahren verstärkt nach neuen Testsystemen zum Nachweis der SCMC gesucht.

Bei einigen dieser Methoden wird die Freisetzung von in den Zielzellen enthaltenen Enzymen (alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase) gemessen, um so den Grad der Zielzellinaktivierung zu bestimmen (47).

Ein anderes Verfahren schlägt die Markierung der Zielzellen mit Carboxyfluoreszeindiacetat (c'FDA) vor, einem Substrat, das nur lebende Zellen fluoreszieren läßt. Über quantitative Zytofluorimetrie kann dann aus dem Anteil noch lebender Zellen die spezifische Zielzelllysis durch die Effektorzellen ermittelt werden (72).

Ebenfalls auf fluoreszierendem Farbstoff basiert die von BLOMBERG et al. (3) ausgearbeitete Methode. Hier werden die Zielzellen vor Inkubation mit den zytotoxischen Effektorzellen mit Europiumdiethylenetriaminopentaacetat (EuDTPA)-Chelaten markiert. Die Menge des freigesetzten Markers wird über die Fluorimetrie bestimmt und ist direkt proportional zur Schädigung der Zielzellen.

Die beschriebenen, auf Zielzellmarkierung mit Enzymen oder Farbstoffen basierenden Verfahren sind durchwegs weniger kosten- und zeitaufwendig als der ^{51}Cr -Freisetzungstest, und auch die ermittelten Testergebnisse entsprechen denen des ^{51}Cr -Tests voll und ganz (3,47,72). Aus diesen Gründen kann davon ausgegangen werden, daß der ^{51}Cr -Test in den nächsten Jahren von weniger risikoreichen Methoden verdrängt werden wird.

2.1.6 Möglichkeiten der Gewinnung und Charakterisierung von Effektorzellen der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität beim Hund

Effektorzellen der SCMC werden am lebenden Hund fast ausschließlich aus dem peripheren Blut gewonnen, doch ist auch die Entnahme von Knochenmark mit nachfolgender Isolierung von NK-Zellen bzw. Vorläuferzellen der SCMC möglich (57,87).

Um eine genaue Charakterisierung vornehmen zu können, müssen die potentiellen Effektorzellen vom Vollblut abgetrennt und anschließend die verschiedenen Zellarten einzeln untersucht werden. Eine Abgrenzung der Zellfraktionen voneinander geschieht über morphologische, physikalische und funktionelle Unterschiede (s. Tab. 1).

So trennte BØYUM (4) die mononukleären Leukozyten aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Dichte von den polymorphkernigen Granulozyten des Humanblutes ab.

Diese sogenannte Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation wurde auch bei der Auftrennung von Hundeblut angewandt, wobei die Ergebnisse wegen Verunreinigung der mononukleären Fraktion

mit Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten wiederholt unbefriedigend waren (13,42,53,93,107). Die Ursache hierfür liegt in den ähnlichen Dichte- und Größeverhältnissen der Hundeleukozyten begründet, ein Nachteil der durch Hintereinanderschaltung mehrerer Separationsmethoden ausgeglichen wurde:

Vor Durchführung der Methode nach BØYUM (4) defibrinisierte ein Teil der Autoren das Hundeblut unter Zuhilfenahme von Glasperlen, um eine Aggregation von Thrombozyten und Neutrophilen im mononukleären Saum nach Dichtegradientenzentrifugation zu verhindern (93,94,107). Die Beseitigung der Erythrozyten wurde durch hypotone Schocklysis mit Aqua destillata (42,93,94,107) bei sofort anschließender Wiederherstellung der Isotonie durch eine Salzlösung durchgeführt. Auch Ammoniumchloridpuffer wurde in diesem Zusammenhang mit Erfolg verwendet (48). Dagegen gelang die Ausfällung der Erythrozyten mit Dextran beim Hund nicht (49).

Im Anschluß an die Dichtegradientenzentrifugation morphologisch ausgewertete Zellausstriche zeigten, daß sich die isolierte Leukozytenfraktion zu 65-85% aus Lymphozyten, zu 5-20% aus polymorphkernigen Granulozyten und zu 1-12% aus Monozyten bzw. Makrophagen zusammensetzte (42,49,50).

Um eine reine Lymphozytenfraktion zu erhalten, wird häufig die Carbonyleisenmethode empfohlen (12,13,42,94,100,107). Dabei nehmen phagozytierende Zellen aus dem Vollblut zunächst das Carbonyleisenpulver auf und werden in einem weiteren Schritt entweder über einen Magneten oder über die Dichtegradienten-

zentrifugation von den Lymphozyten abgetrennt. Nachteilig an dieser Methode ist, daß die entfernten phagozytosefähigen Zellen nicht mehr auf potentielle spontane Zytotoxizität hin getestet werden können.

Eine weitere Möglichkeit, neutrophile Granulozyten sowie Monozyten/Makrophagen von den Lymphozyten abzutrennen, liegt in ihrer Fähigkeit zur Adhärenz an Glas- oder Plastikoberflächen (12,52,93,100). Da auch B-Lymphozyten die Tendenz haben, an Oberflächen anzuhaften, verunreinigen sie möglicherweise die adhärente Phagozytenfraktion (93). Dies ist jedoch für die Messung der SCMC ohne Bedeutung.

Ein Teil der anhaftenden Zellen kann durch Abschaben mit einem sogenannten "Rubber policeman" wiedergewonnen werden oder aber durch Inkubation und Ablösung mit einem EDTA-haltigen Medium bei Anwendung der Methode nach KUMAGAI et al.(52).

Die verbleibende Lymphozytenfraktion wird über Filtration durch Säulen aus Nylonfaser, Glasperlen, Glaswolle oder Baumwolle noch weiter von Verunreinigungen mit Phagozyten befreit (12,32,36,98). Gleichzeitig geschieht damit die Trennung von B- und T-Lymphozyten, weil die Oberflächen-Ig-tragenden B-Zellen an den Säulen haften bleiben (12,32,36,98). Allerdings gehen bei dieser Methode ca. 50% der T-Lymphozyten verloren, da sie ebenfalls in den Säulen zurückbleiben. Die nicht adhärente Fraktion im Eluat besteht zu mehr als 95% aus T-Lymphozyten. Denkbar ist auch eine Abtrennung der B-Zellen über die Affinitätschromatographie (12,32), die jedoch beim Hund in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle spielt.

Häufig verwendet werden dagegen die Rosettentechniken zur Differenzierung von T- und B-Lymphozyten sowie zur Zellcharakterisierung über Oberflächenrezeptoren (7,18,48,50,84,93,94,116). Humane T-Zellen und z.T. auch NK-Zellen bilden mit Schaferythrozyten spontan Rosetten über einen Rezeptor auf ihrer Oberfläche (12,77). Beim Hund kommt es zur spontanen Rosettenbildung mit Human- und Meerschweinchenerythrozyten durch T-Zellen, Neutrophile, Monozyten und tote Zellen (18,48,50,93), so daß die Rosettenbildung hier nicht als T-zellspezifisch betrachtet werden kann.

Auch die Rosettenbildung mit antikörper- und komplementbeschichteten Schaferythrozyten, die C3- Rezeptoren auf Zelloberflächen tragen, ist beim Hund nicht nur für B-Zellen sondern auch für Monozyten und Granulozyten typisch (84). Der Fc-Rezeptor wird durch Bindung antikörperbeschichteter Schaferythrozyten an Zellen nachgewiesen (12,84,94,116). Über die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation lassen sich Rosetten und ungebundene Zellen trennen (48,116).

Bei Vorliegen einer annähernd reinen T-Lymphozytenfraktion kann ein weiterer Separationsschritt vorgenommen werden. Durch den von TIMONEN und SAKSELA (100) entwickelten diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten gelingt eine Auftrennung in kleine, mittlere und große (LGL) Lymphozyten. LOUGHRAN et al. (57) wandelten den Gradienten für die Separation von Hundelymphozyten ab.

Eine andere Möglichkeit der Charakterisierung spontan Zytotoxischer Effektorzellen liegt in ihren unterschiedlichen Reak-

tionen auf verschiedenste Stoffgruppen wie z.B. Immunmodulatoren, Arzneimittel oder Chemikalien (21,28,35,77,96).

Als ergänzende Maßnahme kann die morphologische (87,101) und zytochemische (74,90,93,110) Identifizierung der Effektorzellen gelten.

Der Entwicklung monoklonaler Antikörper (1,31,57,77) und vorangehend spezifischer Antiseren (48) ist es zu verdanken, daß der Phänotyp der NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten weitgehend aufgeklärt werden konnte. In der Veterinärmedizin ist diese Zellidentifizierungsmethode für die meisten Haustiere noch nicht etabliert; doch es bleibt zu hoffen, daß die vielversprechenden Möglichkeiten, die die Anwendung monoklonaler Antikörper bei der Aufklärung des Phänomens der SCMC des Hundes bringen könnte, in den nächsten Jahren weiterentwickelt werden.

Tabelle 1: Morphologische und funktionelle Charakteristika von Effektorzellen der SCMC

MERKMAL	MONOZYTEN/ MAKRO- PHAGEN	NEUTROPH. GRANULO- ZYTEN	NK-ZELLEN VERGLEICHEND BEI MENSCH UND HUND
Zellgröße	16-20µm	12-18µm	16-20µm
Verhältnis von Zytoplasma zu Zellkern	hoch	hoch	hoch
Zellkern	stark ein- gezogen	gelappt	leicht eingezogen, nierenförmig
<u>Zytoplasmale</u> <u>Enzyme (85)</u>			
Peroxidase	±	+	-
Alkalische Phosphatase	-	+	-
Saure Phosphatase	+	+	+
Unspezif. Esterase (110)	+	-	+
			± (74, 90, 93)
<u>Spez. Dichte (13)</u>			
Mensch	1,072g/cm³	1,091g/cm³	1,072g/cm³
Hund	1,065g/cm³	1,077g/cm³	1,071g/cm³
<u>Allg. Eigenschaften</u>			
Oberflächen- adhärenz	+	+	-
Phagozytose	+	+	-
ADCC	+	+	+
			+(57)

Fortsetzung Tabelle 1:

MERKMAL	MONOZYTEN/ MAKRO- PHAGEN	NEUTROPH. GRANULO- ZYTEN	NK-ZELLEN VERGLEICHEND BEI MENSCH UND HUND	
<u>Zelloberflächen- marker</u>				
Rezeptoren für Schaf- erythrozyten	-	-	50% (R mit geringer Affinität)	Meersch.- erythro- zyten
Rezept. für das Fc-Frag- ment von IgG	+	+	(auf den mei- sten Zellen)	+ (bei ca. 40%)
Rezeptoren für C3b	+	+	-	-
Lymphokinre- zeptoren	gamma-IFN		IL 2, alpha-, beta-, gamma-IFN	n.b.
<u>Oberflächen- antigene</u> (Reaktion mit den monoklo- nalen Anti- körpern:)	OKM 1, αIa, (85) MO 2, anti- asialo GM 1, (77)	B73.1, OKM 1, αIa, anti- asialo GM 1 (1,31)	OKM 1, anti- asialo GM 1, OKT8/OKT10/ OKT11, αIa, HNK-1, VEP 13, B73.1, H25,, H366, N901, (1)	Thy-1, Dly-1, Dly-6, 1A1, E-11, αIa, (57)
<u>Wachstums- faktoren</u>	CSF (31)	CSF (31)	IL 2	n.b.
<u>Sekretion von Faktoren</u>	TNF-α, IL 1, gamma-IFN, CSF, LAF, PG, Enzyme	Enzyme	IL 1, IL 2, alpha-, gamma- IFN, CSF, BC GF, NKCF, TNF-α, LT, Cytolysin, LRG	n.b.
<u>Zeitraum bis zum Beginn der SCMC in vitro</u>	4-18h und länger (19,31)	inner- halb von Minuten (31)	Minuten bis Stunden (stark ab- hängig vom Zielzelltyp)	vermutlich länger als beim Msch. -Max. erst nach 18h

n.b.=nicht bekannt; C3b=3.Komplementkomponente; R= Rezeptor;
Die Zahlen in Klammern geben die Literaturstellen zu den im
fortlaufenden Text nicht bereits erwähnten Informationen an.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Probanden

Als Blutspender dienten Hunde verschiedener mittlerer bis großer Rassen. Es erwies sich im Großen und Ganzen als technisch recht schwierig, regelmäßig die für die einzelnen Versuche benötigten Mengen frischen Hundesblutes aus den Kliniken zu bekommen. Deshalb blieben Geschlecht und Alter der getesteten Tiere völlig dem Zufall überlassen.

Insgesamt kam Spenderblut von 37 Tieren zur Auswertung. 18 Hunde stammten aus der Zucht der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH (GSF) in München-Neuherberg, 16 aus der Chirurgischen Tierklinik sowie weitere 3 Hunde aus der Klinik für Innere Krankheiten der Tierärztlichen Fakultät München. Bei den Hunden aus den Kliniken handelte es sich um Patienten, die nur wenige Stunden bis Tage wegen chirurgischer Eingriffe oder anderer therapeutischer Maßnahmen stationär aufgenommen waren. Bezüglich Haltung, Fütterung, Gesundheitszustand und Impfstatus liegen für diese Tiere keine zuverlässigen Informationen vor. Dagegen ist von den getesteten Hunden aus der GSF bekannt, daß sie gleichen Haltungsbedingungen unterworfen und bei der Blutentnahme gesund waren. Die Tiere wurden regelmäßig zur Bekämpfung von Endo- und Ektoparasiten behandelt und gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis sowie Leptospirose geimpft. Tabelle 2 im Anhang enthält eine Auflistung der Probanden.

3.1.2 Blutentnahme

Für die Versuche wurden pro Hund 20-50 ml heparinisiertes Vollblut benötigt.

Die Blutentnahme erfolgte bei den Tieren aus der GSF durchwegs aus der Vena jugularis externa. Den Hunden aus den Tierärztlichen Kliniken wurde das Blut aus der Vena cephalica antibrachii bzw. dem Ramus cranialis der Vena saphena lateralis entnommen. Das gewonnene Blut wurde in NH₄ Heparinat-Röhrchen (Fa. Sarstedt, Nürnberg) aufgefangen und innerhalb der folgenden 1-3 Stunden weiterverarbeitet.

3.1.3 Gewinnung und Separation von Effektorzellen der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität aus dem peripheren Blut

3.1.3.1 Isolierung von mononukleären Leukozyten ----- nach dem Ficoll-Dichtegradientenverfahren -----

Aus dem heparinisierten Hundeblut wurden über die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation nach BØYUM (4) die mononukleären Leukozyten isoliert.

Dafür wurde das Blut zunächst im Verhältnis 1:2 mit PBS (Phosphate Buffered Saline; Fa. Merck, Darmstadt) verdünnt. Dann wurden 4 Teile Ficoll-Hypaque (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/cm³; Fa. Seromed, Biochrom KG, Berlin) in ein Glaszentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 5 Teilen des verdünnten Blutes vorsichtig überschichtet und 35 Minuten bei 400g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Bedingt durch die verschiedenen Dichten der flüssigen Phasen sollten die einzelnen Blutzellarten entsprechend ihrer Masse unterschiedlich weit nach unten durch den Ficoll-Dichtegradienten hindurch wandern.

So erwartete man Erythrozyten und Granulozyten im Bodensatz, jedoch vereinzelt auch im Ficoll-Hypaque-Gemisch darüber. Oberhalb des Bodensatzes folgte eine schmale, opaleszierende Bande aus mononukleären Leukozyten (Interphase). Die oberste, sehr breite Schicht des Gradienten wurde von einem Plasma-PBS-Gemisch gebildet, in dem sich Thrombozyten befinden sollten. Dieser breite Überstand wurde bis wenige mm über der Interphase abgesaugt, bevor die mononukleären Zellen mit einer zweiten Pipette vorsichtig entnommen und auf Plastikzentrifugenröhrchen verteilt wurden. Durch Verdünnen der abgenommenen Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) im Verhältnis 1:3 und anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 100g und Raumtemperatur wurden die Zellen zum ersten Mal gewaschen. Der thrombozytenreiche Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 8 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert und der Waschvorgang wiederholt. Die so gewonnenen Zellen wurden in RPMI 1640 (Fa. Seromed, Biochrom KG, Berlin) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS; Flow Laboratories Inc., Rockville, Md., U.S.A.) resuspendiert, gezählt und der Anteil der lebenden Zellen überprüft (s.u.).

Dem verwendeten Medium RPMI 1640 wurden grundsätzlich folgende Zusätze pro 1000 ml beigegeben:

2.5 mM Hepes-Puffer (Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)

2 mM L-Glutamin (Fa. Sigma, Deisenhofen)

100 000 IE Penicillin G (Fa. Höchst HG, Frankfurt/Main)

0.1 g Streptothekenat^R (Fa. Grünenthal GmbH, Stolberg)

Zellzählung und Vitalitätsprüfung

Zellzählung und Zellvitalitätsprüfung wurden in einem Arbeitsgang gleichzeitig durchgeführt (Methode nach BØYUM(4)).

Hierzu wurden 0,1 ml Zellsuspension zu 0,9 ml einer 0,05%-igen Trypanblaulösung (Fa. Carl Roth OHG, Karlsruhe) gegeben. Nach kräftiger Durchmischung wurde die so im Verhältnis 1:100 verdünnte Zellsuspension in einer Liquorzählkammer nach Fuchs-Rosenthal gezählt und die gewünschte Zellzahl/ml Medium unter Zuhilfenahme folgender Formel (68) eingestellt:

$$\text{Verdünnungsfaktor/Sediment} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 5000 \times \text{Vorverdünnung der Zellen}}{\text{gewünschte Zellzahl/ml Medium}}$$

Bereits während der Zellzählung wurde auf eine eventuelle Blaufärbung toter Zellen geachtet und daraus der prozentuale Anteil der lebenden Zellen berechnet.

Nur Zellsuspensionen mit mehr als 95% lebensfähigen Zellen wurden für den Versuch weiterverwendet.

3.1.3.2 Abtrennung adhärenter Zellen durch Inkubation auf Plastik

Die Inkubation der Effektorzellen auf Plastik wurde auf FKS-beschichteten Plastikzellkulturflaschen (75 cm² und 175 cm²; Falcon, Becton Dickinson & Co Labware, Oxnard, CA., U.S.A.) nach der bei KUMAGAI (52) beschriebenen Methode durchgeführt. Auf jede Zellkulturflasche wurden 3 ml (75 cm²) bzw. 8-10 ml (175 cm²) FKS gegeben, das vorher 30 Minuten lang bei 56°C hitzeinaktiviert worden war. Die so vorbereiteten Plastikgefäße verblieben über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Am darauffolgenden Tag wurden sie dreimal mit PBS gespült und konnten anschließend entweder sofort gebraucht oder aber bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die kleinen Zellkulturflaschen (75 cm²) wurden mit $1-2 \times 10^7$ der im Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen beschickt, die großen Flaschen (175 cm²) mit ca. 5×10^7 Zellen. Diese Zellen waren vorher in 10 ml bzw. 15-20 ml RPMI 1640 mit einem Zusatz von 10% FKS aufgenommen worden.

Nach 60 Minuten Inkubation der Plastikgefäße bei 37°C (CO₂-Brutschrank) wurde das Medium in Zentrifugenröhrchen dekantiert.

Die im Medium enthaltenen Zellen wurden abzentrifugiert, auf ihre Lebensfähigkeit und Zellzahl hin überprüft (s. 3.1.3.1) und erhielten die Bezeichnung "nicht plastikadhärente Zellen". Um auch die "leicht plastikadhärenten Zellen" von der Plastikoberfläche zu entfernen, wurde diese fünfmal mit kaltem (4°C) RPMI 1640 + 10% FKS gespült. Das Waschmedium wurde gesammelt,

abzentrifugiert und die darin enthaltenen Zellen gezählt. Der überwiegende Teil der nun noch der Plastikoberfläche anhaftenden "stark plastikadhärenten Zellen" konnte durch Inkubation mit PBS, dem 0,2% EDTA und 5% FKS zugefügt waren, gewonnen werden. Dazu verblieben die Plastikgefäße für 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank, wurden anschließend kräftig geschüttelt, das PBS abgegossen und nach Zentrifugation die Zellzählung durchgeführt. Zur Einstellung der gewünschten Zellzahl wurden die Zellen in PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) aufgenommen, um ein erneutes Anhaften der Zellen, diesmal an der Plastikwand des Zentrifugenröhrchens, zu verhindern. Erst kurz vor Einsaat der stark plastikadhärenten Zellen in die ^{51}Cr -Testplatten wurde dieses Medium gegen RPMI 1640 + 10% FKS ausgetauscht.

3.1.3.3 Abtrennung phagozytosefähiger Zellen mit Carbonyleisenpulver

Die Abtrennung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut geschah anhand der von MANDEVILLE et al. (61) beschriebenen Carbonyleisenmethode.

Hierfür wurden zu je 10 ml heparinisiertem Vollblut 100 mg steriles Carbonyleisenpulver (durchschnittliche Partikelgröße 4,5-5,2 μm ; Fa. Sigma, Deisenhofen) gegeben. Diese Mischung wurde in einem Erlenmeyerkolben 45 Minuten unter leichtem Schütteln (elektrischer Schüttler) im Brutraum bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt, 4 Teile Ficoll-Trennmedium in einem Glaszentrifugenröhrchen vorgelegt und darauf 5 Teile des verdünnten Blutes

geschichtet.

Nach 35-minütiger Zentrifugation bei 400g und Raumtemperatur befanden sich die Erythrozyten, das überschüssige Carbonyleisenpulver sowie sämtliche Granulozyten und Monozyten, die Carbonyleisenpulver phagozytiert hatten, im Bodensatz. Die Lymphozyten der Interphase wurden abgenommen, zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen, gezählt und ihre Vitalität geprüft (s. 3.1.3.1).

3.1.3.4 Trennung von Lymphozyten über die Nylonfasersäule

Die Trennung in T- und B-Lymphozyten wurde in Anlehnung an JULIUS et al.(36) und THAM et al.(98) durchgeführt. Es kam Nylonwatte aus Leuko-Pak Leukozytenfiltern (Fa. Fenwal Laboratories, Deerfield, Ill., U.S.A.) zur Anwendung, die vorher eine Woche lang in Aqua destillata gewaschen und anschließend bei 37°C getrocknet worden war. Je 0,6 g Nylonwatte wurden locker in 10 ml-Plastikspritzen mit aufgesetzten Kanülen gepackt, beidseitig mit Aluminiumfolie verschlossen und autoklaviert. Die so vorbereiteten Nylonfasersäulen wurden vor Gebrauch mit 10 ml RPMI 1640 + 5% FKS gefüllt, wieder verschlossen und für eine Stunde bei 37°C aufbewahrt. Danach wurde das überschüssige Medium abgelassen, die Kanüle wieder aufgesetzt und die Nylonfasersäule mit $1-5 \times 10^7$ nicht plastikadhärenten Zellen beschickt. Diese waren in 1-2 ml Medium aufgenommen worden. Nach erneutem Verschuß der Säule wurde sie weitere 60 Minuten in vertikaler Position in den 37°C-Brutschrank gestellt. Das Ausspülen der nicht nylonadhärenten Zellen geschah durch

langsameres Waschen mit vorgewärmtem RPMI 1640 + 5% FKS. Das Medium wurde in Plastikröhrchen gesammelt und bei 200g und Raumtemperatur für 10 Minuten abzentrifugiert. Die nylonadhärenten Zellen konnten durch Schwenken der Nylonwolle in 50 ml kaltem (4°C) Medium und nachfolgendes Abzentrifugieren der Zellen gewonnen werden.

Die so erhaltenen Zellen wurden gezählt und auf ihre Vitalität geprüft (s. 3.1.3.1).

3.1.3.5 Diskontinuierlicher Percoll-Dichtegradient

Um die nach der Nylonfasersäule erhaltenen T-Lymphozyten in weitere Subpopulationen zu trennen, kam die diskontinuierliche Percoll-Dichtegradientenzentrifugation nach TIMONEN und SAKSELA (100), modifiziert durch LOUGHRAN et al. (57), zur Anwendung. Die Percoll-Gradienten setzten sich aus sechs Stufen verschiedener Dichte zusammen, die durch Vermischung von unverdünntem, aus der Originalabfüllung entnommenen Percoll (Fa. Pharmacia Chemicals, Uppsala, Schweden) mit unterschiedlichen Mengen Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) hergestellt worden waren. Für die unterste Stufe des Gradienten wurden $3-5 \times 10^7$ nicht nylonadhärenter Zellen in 9 ml einer 50%-igen Percollösung aufgenommen und in ein 50 ml-Glaszentrifugenröhrchen pipettiert. Darauf wurden fünf weitere Verdünnungsstufen von je 6 ml vorsichtig geschichtet, wobei in der untersten der Percollanteil 47,5% und in der obersten 37,5% betrug. Zwischen den einzelnen Stufen nahm der Percollanteil um jeweils 2,5% ab. Auf die vorgelegten sechs Schichten wurden noch 3 ml PBS gegeben, bevor das

Zentrifugenröhrchen verschlossen und bei 550g und Raumtemperatur für 30 Minuten zentrifugiert wurde.

Da beim Hund, verglichen mit dem Menschen (vgl. 100), nur geringe Zahlen nicht nylonadhärenter Zellen zur Verfügung standen, mußten die nach Zentrifugation des Percoll-Dichtegradienten erhaltenen Zellen der einzelnen Stufen gepoolt werden. Hierbei wurden die Fraktionen 1-3 als "Fraktionen niederer Dichte", die Fraktionen 4-6 als "Fraktionen mittlerer Dichte" sowie Fraktion 7 als "Fraktion hoher Dichte" bezeichnet. Die so gepoolten Fraktionen wurden in Plastikzentrifugenröhrchen übergeführt, einmal mit RPMI 1640 + 10% FKS gewaschen und die Zellzählung durchgeführt (s. 3.1.3.1).

3.1.4 Produktion zytotoxisch wirkender, löslicher Überstände

Für die Produktion zellfreier Überstände von Effektor-Zielzell-Gemischen wurden die Techniken von WRIGHT et al.(109) sowie SAYERS et al.(88) etwas modifiziert angewandt.

Die separierten Effektorzellen (s. 3.1.3.1 mit 3.1.3.5) wurden auf 3×10^6 Zellen/ml Medium (RPMI 1640 + 5% FKS) eingestellt und 1 ml von jeder Effektorzellfraktion in 8 ml-Plastik-schraubröhrchen (Nunc, Wiesbaden) gegeben. Zu den vorgelegten Effektorzellsuspensionen wurden als Stimulatorzellen jeweils 1×10^5 Tumorzellen in 1 ml Medium pipettiert, so daß das Effektor-Tumorzellenverhältnis von 30:1 dem des Chromium 51-Freisetzungstest (s. 3.1.5.3) entsprach.

Als Tumorzelllinie wurde ausschließlich ein adhärent wachsendes, canines Thyreoidea-Adenokarzinom (CTAC) (40) verwendet, das

unmittelbar vor Benötigung der Zellen mit einer 0,05%-igen Trypsinlösung von der Zellkulturflasche abgelöst, zentrifugiert (200g, 5 min, 18-20°C) und auf eine Zellzahl von 1×10^5 lebenden Zellen/ml Medium eingestellt wurde.

Nach Durchmischung der Zellsuspensionen wurden die Schraubröhrchen für 18 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschank inkubiert. Anschließend wurden alle Röhrchen bei 200g und Raumtemperatur 10 Minuten lang zentrifugiert und die Zellpelletüberstände durch 0,22 µm-Filter (Fa. Millipore, Neu-Isenburg) filtriert, um etwaige zelluläre Beimengungen sicher zu entfernen.

Als Kontrollen dienten zellfreie Überstände aus Röhrchen, in denen 1 ml RPMI 1640 + 5% FKS ohne Effektorzellen vorgelegt war. Nach Zugabe von 1×10^5 Tumorzellen oder 3×10^6 Effektorzellen in 1 ml Medium wurde dieses Röhrchen denselben Arbeitsschritten unterworfen wie die vorher erwähnten Überstände von Effektor-Tumorzell-Gemischen.

3.1.5 Messung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität

Die spontane zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) der verschiedenen Effektorzellpopulationen bzw. der produzierten Überstände wurde im Chromium 51-Freisetzungstest (⁵¹Cr-Test) (9) gemessen. Hierbei diente die Freisetzung von ⁵¹Cr aus vorher markierten Zielzellen als direkter Nachweis für deren Schädigung oder Lysis und als Maß für die zytolytische Aktivität der Effektorzellen.

3.1.5.1 Effektorzellen und zytotoxische Überstände

Die durch die verschiedenen Separationsmethoden erhaltenen Effektorzellen (s. 3.1.3.1 mit 3.1.3.5) wurden jeweils auf eine Zellzahl von 3×10^6 Zellen/ml Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) eingestellt und bis zur weiteren Verwendung im ^{51}Cr -Test in Plastikschauböhrchen im 37°C-Brutschrank aufbewahrt.

Diese relativ geringe Zahl von Effektorzellen (vgl. 51,57: $6-10 \times 10^6$ Zellen/ml) wurde gewählt, weil es nicht möglich war, über den Versuchszeitraum von 7 Monaten regelmäßig größere Mengen von Hundeblut (≥ 50 ml) zu bekommen. In den meisten Fällen standen nur 10-20 ml Blut zur Verfügung, aus dem dann die Effektorzellen für den ^{51}Cr -Test isoliert werden konnten. Durch das aus diesem Grund für alle Versuche gewählte niedrige Effektor-Zielzellenverhältnis von 30:1 wurde jedoch gewährleistet, daß am Ende der Versuchsreihe die Einzelergebnisse miteinander verglichen werden konnten.

Zellfreie Überstände aus Effektor-Tumorzell(CTAC)-Gemischen (s. 3.1.4) wurden bis zur Messung ihrer potentiell zytotoxischen Aktivitäten bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.5.2 Zielzellen

Als Zielzellen dienten drei xenogene sowie drei allogene Zelllinien (s. 3.2.1.1, Tab.3). Von diesen wuchsen die Linien K562 und P815 in Suspension, die Linien Vero, dog 166/77, CTAC und K-9 dagegen adhärent.

Die adhärenenten Zellen wurden mit einer 0,05%-igen Trypsinlösung von den Zellkulturflaschen abgelöst, bei 200g (18-20°C) für 5

Minuten zentrifugiert und auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt (s. 3.1.3.1). Bei in Suspension wachsenden Zellen konnten Zentrifugation und Zellzählung sofort durchgeführt werden. Sämtliche Zielzellen waren 24-48 Stunden vor Verwendung im ^{51}Cr -Test im Verhältnis 2:1 geteilt worden. Unabhängig von den Erhaltungsmedien der einzelnen Zelllinien, wurde im ^{51}Cr -Test stets RPMI 1640 mit einem Zusatz von 10% FKS verwendet. Die Markierung der Zielzellen mit ^{51}Cr erfolgte durch Kombination der Methoden von KRAKOWKA (51) und LOUGHRAN et al. (57).

Dafür wurde 1 ml der jeweiligen Zellsuspension in ein 8 ml-Plastikschraubröhrchen pipettiert, abzentrifugiert (200g, 5 min) und der Überstand abgegossen. Zu den im Röhrchen verbleibenden 100 μl Zellsuspension (2×10^6 Zellen) wurden 100 μCi $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (spez. Aktivität 250-500 mCi/mg ^{51}Cr ; Radiochemical Centre LTD, Amersham, England) gegeben, die Zellen resuspendiert und für 90 Minuten bei 37°C im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 5 ml kaltem (4°C) Medium gewaschen, in 2 ml Medium (4°C) resuspendiert und weitere 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die markierten Zielzellen noch zweimal gewaschen und danach das Zellpellet in 20 ml Medium aufgenommen (1×10^6 Zellen/ml).

3.1.5.3 Chromium 51-Freisetzungstest

Der ^{51}Cr -Test wurde in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, U-Form; Fa. Greiner, Nürtingen) durchgeführt. Zunächst wurden in

die Plattenvertiefungen serienmäßige Zweierverdünnungen (≈ 100 μ l) der Effektorzellen (3×10^6 /ml) bzw. der Überstände (100 Vol.%) in identischen Triplets vorgelegt, auf die dann mit einer 12-Kanal-Pipette (Titertek^R, Flow Laboratories Inc., Rockville, Md., U.S.A.) je 100 μ l der Zielzellsuspension (1×10^4 Zellen/0,1 ml) gegeben wurden.

Zur Feststellung der spontanen Freisetzung des ^{51}Cr aus den Zielzellen (spontaneous release, SR) wurden zu je 100 μ l der Zielzellsuspension dieselbe Menge Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) gegeben.

Die maximal mögliche ^{51}Cr -Freisetzung (maximum release, MR) erhielt man durch Zugabe von 100 μ l 5%-igen Triton X-100 (Fa. Sigma, Deisenhofen) zu 100 μ l der markierten Zielzellen.

Nach Versiegelung der Platten mit einer Plastikfolie (Falcon-Film; Becton Dickinson & Co Labware, Oxnard, Ca., U.S.A.)

folgte eine Inkubationsdauer von 4 bzw. 18 Stunden im CO_2 -Brutschrank bei 37°C . Anschließend wurden die Platten bei 200g für 5 Minuten zentrifugiert, bevor aus jeder Vertiefung 100 μ l Überstand abpipettiert und in 2 ml- Eppendorfreaktionsgefäße (Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg) überführt wurden. Die Gammastrahlung des freigesetzten ^{51}Cr wurde in einem Gamma-Counter 1197 der Fa. Searle Analytic Inc. (G.D.Searle GmbH, Chicago, Ill., U.S.A.) in Counts pro Minute (cpm) gemessen.

Die Zytotoxizität in Prozent (% spezifische Lysis) wurde nach folgender Formel errechnet, wobei jeweils die Mittelwerte der Triplets $\pm$ der Standardabweichung in die Rechnung eingingen:

$$\% \text{ Spezifische Lysis} = \frac{\text{Testcounts} - \text{Spontancounts}}{\text{Maximalcounts} - \text{Spontancounts}} \times 100$$

Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Arithmetischer Mittelwert } \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Standardabweichung } s = \frac{\sqrt{\sum (\bar{x} - x)^2}}{n - 1}$$

$$\text{Standardfehler } s_e = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$\text{PEARSONScher Korrelationskoeffizient } r = \frac{\sum x \cdot y - \frac{1}{n} \cdot \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{1}{n} \cdot \sum x^2\right) \left(\sum y^2 - \frac{1}{n} \cdot \sum y^2\right)}}$$

3.1.6 Weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität beim Hund

3.1.6.1 Anti-asialo GM 1 Antikörper -----

Es wurde geprüft, ob der polyklonale Antikörper gegen das Zelloberflächenantigen ganglio-N-tetraosylceramide "asialo GM 1" auf murinen (39,114) und humanen (76) NK-Zellen auch beim Hund eine Reduktion der im ^{51}Cr -Test gemessenen spontanen zellvermittelten Zytotoxizität bewirken konnte (112).

Durchführung

Von den mit polyklonalem Antikörper zu behandelnden Effektorzellfraktionen wurden je 3×10^6 Zellen/ml Medium (RPMI 1640 + 10% FKS) in je zwei Plastikschauböhrchen gegeben und abzentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden die Zellen im ersten Röhrchen in 100 μl anti-asialo GM 1 Antikörper (1 ml; Fa. Paesel GmbH & Co, Frankfurt/Main), 1:50 in RPMI 1640 verdünnt, resuspendiert. Die Zellen in Röhrchen 2 wurden lediglich in RPMI 1640 aufgenommen und beide Röhrchen für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann kamen in jedes Röhrchen zusätzlich 25 μl Kaninchenkomplement (Behringwerke AG, Marburg), worauf weitere 45 Minuten Inkubation bei 37°C folgten.

Anschließend wurden die Zellen einmal in Medium gewaschen und das Ausgangsvolumen im Röhrchen von 1 ml wiederhergestellt (3×10^6 Zellen/ml Medium).

3.1.6.2 L-Leucin Methylester

Mit Hilfe des lysosomotropen Agens "L-Leucin Methylester" wurde die Bedeutung lysosomaler Granula für die spontane zellvermittelte Zytotoxizität beim Hund überprüft (92).

Durchführung

Pro Effektorzellfraktion wurden zwei Plastikschaubröhrchen mit je 1 ml Zellsuspension (3×10^6 Zellen/ml Medium) gefüllt und abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in Röhrchen I in 1 ml 20mM bzw. 40mM L-Leucin Methylester (MG 181,3; Fa. Sigma, Deisenhofen) aufgenommen, die Zellen in Röhrchen II in 1 ml Medium. Dann folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 37°C im CO₂-Brutschrank mit anschließendem Waschen der Zellen und Wiederauffüllen des Mediums auf 1 ml (3×10^6 Zellen/ml) Gesamtvolumen.

3.1.6.3 Morphologische und zytochemische Untersuchung ----- der Effektorzellen -----

Färbung nach Pappenheim

Für die Färbung nach Pappenheim wurden auf Objektträgern Ausstriche der einzelnen Effektorzellfraktionen angefertigt, indem man einen Tropfen Zellsuspension (auf 3×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt) mit einem Deckgläschen ausstrich. Die Ausstriche wurden über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag 10 Minuten in Aceton fixiert.

Nach dem Trocknen wurden die Objektträger 5 Minuten mit May-Grünwaldlösung (Fa. Merck, Darmstadt) bedeckt, mit Aqua destillata abgespült (2 Minuten Einwirkungszeit) und mit Giemsa-

Gebrauchslösung (20%-ig, verdünnt mit Aqua dest.; Fa. Merck, Darmstadt) 15 Minuten nachgefärbt.

Danach wurde der Farbstoff abgekippt, mit Aqua dest. gespült (Einwirkzeit 3 Minuten) und luftgetrocknet.

Peroxidasefärbung

Die luftgetrockneten Ausstriche für die Peroxidasefärbung wurden wie oben beschrieben hergestellt und über Nacht luftgetrocknet.

Dann wurden die Objektträger 60 Sekunden lang bei Zimmertemperatur in einer Mischung von 10 ml 37%-igen Formaldehyd und 90 ml absoluten Äthylalkohol fixiert, um gleich anschließend für 15-30 Sekunden mit Aqua dest. gespült zu werden.

Die noch feuchten Objektträger wurden nun für 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in das Kaplow-Medium (38) gestellt, danach kurz gewaschen und luftgetrocknet.

Im Anschluß an die jeweilige Färbung wurden die Ausstriche bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet und ausgewertet.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Vorversuche

3.2.1.1 Spezifizität der Effektorzellen

Von sechs getesteten Zielzelllinien (s. Tab. 3) waren alle Chromium 51-markierbar und gaben die aufgenommene Radioaktivität während einer Inkubationsdauer von 18 Stunden auch in tolerierbarem Maß ($SR \leq 30\%$) wieder ab.

Im Chromium 51-Freisetzungstest wurden jedoch nur die beiden allogenen Tumorzelllinien K-9 und CTAC (40) von allen isolierten Hundeeffektorzellpopulationen in ausreichendem Maße lysiert, wobei die Lysierbarkeit des Melanoms gerade halb so hoch war wie die des Thyreoidea-Adenokarzinoms.

Aus diesen Gründen wurden alle folgenden Versuche ausschließlich mit dem caninen Thyreoidea-Adenokarzinom CTAC (436.-483. Passage) durchgeführt.

Tabelle 3: Getestete Zielzellen für den Chromium 51-
Freisetzungstest

VERWENDETE ZIELZELLEN -BEZEICHNUNG	ZELLART	EIGNUNG FÜR DEN ⁵¹ CR-TEST ^a
<u>Xenogener</u> <u>Herkunft:</u>		
K 562 ^a (Mensch)	Chronische Erythroleuko- blastose	bedingt geeignet - geringe spezif. Lysis im Test
P 815 ^b (Maus)	Mastozytom	nicht geeignet - nicht lysierbar
Vero ^b (Affe)	Nieren- zelllinie	bedingt geeignet - geringe spezif. Lysis im Test
<u>Allogener</u> <u>Herkunft:</u>		
dog 166/77 ^c	Gliom	bedingt geeignet - geringe spezif. Lysis im Test
K-9 ^d	Melanom	geeignet - spezif. Lysis ca. 50% ge- ringer als CTAC
CTAC ^d	Thyreoidea- Adeno- karzinom	sehr gut geeignet

* gemessen an der Höhe der ⁵¹Cr-Freisetzung aus den Zielzellen
(in % spezifischer Lysis)

^a freundlicherweise überlassen von Prof. H. Kirchner, Heidelberg

^b American Type Culture Collection

^c freundlicherweise überlassen von Prof. D. Stavrou, München

^d " " " Prof. St. Krakowka, Columbus,
Ohio

3.2.1.2 Kinetik der Tumorzelllysis im Chromium 51-

Freisetzungstest (^{51}Cr -Test)

In Vorversuchen wurden ^{51}Cr -Tests mit 4 und 18 Stunden Inkubationsdauer durchgeführt. Die spontane ^{51}Cr -Freisetzung (SR) aus den Zielzellen betrug beim 4 h-Test 8,2% (7,0-10,5% / n=3) der insgesamt aufgenommenen Radioaktivität, beim 18 h-Test dagegen 20,5% (12,0-30,9% / n=24).

Mit zunehmender Inkubationsdauer stieg auch die Anzahl der im Test lysierten Tumorzellen steil an.

So wurden von im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Effektorzellen im 18 h-Test je nach Effektor-Zielzellenverhältnis um 48-67% mehr CTAC lysiert, von nicht plastikadhärenten Zellen sogar 80-94% (s. Tab. 4, Abb. 2).

Da im ^{51}Cr -Test ein SR von $\leq 30\%$ noch vertretbar war und außerdem die Höhe der im 18 h-Test erreichten Lysiswerte eine Erfassung der SCMC des Hundes auch bei großen individuellen Schwankungen gewährleisteten, wurde in der Folge immer eine Testdauer von 18 Stunden gewählt.

Bereits in den Vorversuchen wurde festgestellt, daß die SCMC einer Dosis-Wirkungs-Beziehung unterliegt, derzufolge die Zunahme an Effektorzellen einen Anstieg der Tumorzelllysis bewirkt.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Zielzellysis (CTAC) von Testdauer
und Anzahl an potentiellen Effektorzellen

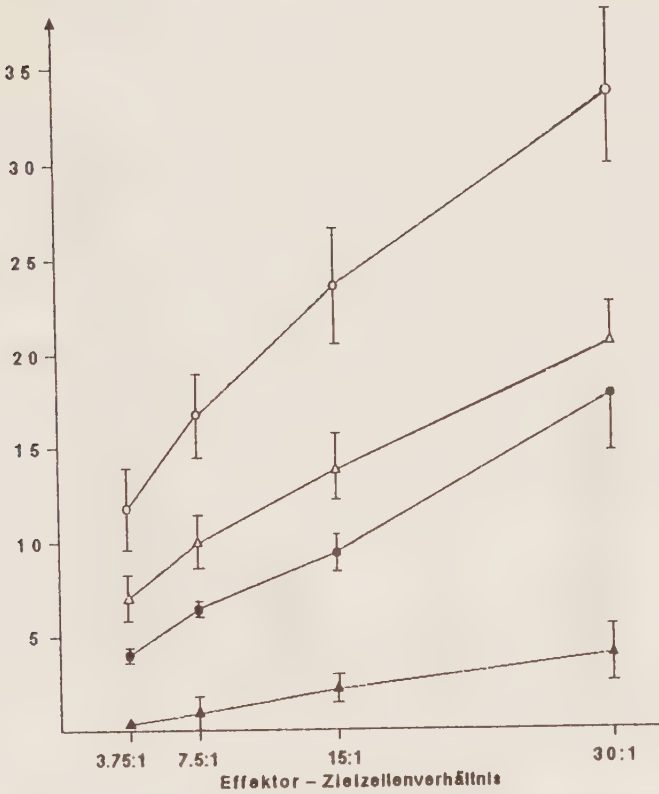
EFFEKTOR- ZELL- FRAKTION	TEST- DAUER	% SPEZIFISCHE LYSIS ($\bar{x} \pm s_e$)			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
im Ficoll- Dichte- gradienten- verfahren isolierte Zellen	4h	17,7±3,2 (4)	9,4±1,0 (4)	6,4±0,4 (4)	3,9±0,4 (4)
	18h	34,1±3,9 (30)	23,6±3,0 (30)	16,7±2,3 (30)	11,9±2,2 (29)
nicht plastik- adhärente Zellen	4h	4,1±1,5 (2)	2,3±0,7 (2)	1,0±0,9 (2)	0,4±0 (2)
	18h	20,6±2,3 (21)	13,7±1,8 (22)	10,0±1,4 (22)	6,9±1,2 (21)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler

(n) = Anzahl getesteter Hundeblutproben

Abbildung 2: Kinetik der Zielzelllysis (CTAC) im Chromium 51-Freisetzungstest

% spez. Lysis
von CTAC



○ = Im Ficoll - Dichtegradientenverfahren isolierte Effektorzellen,
Inkubationsdauer 18 h (n=30)

● = wie ○ , bei Inkubationsdauer von 4 h (n=4)

△ = nicht plastikadhärente Effektorzellen, Inkubationsdauer 18 h (n=22)

▲ = wie △ , bei Inkubationsdauer von 4 h (n=2)

Die Abweichungen von den Einzelpunkten geben den Standardfehler wieder.

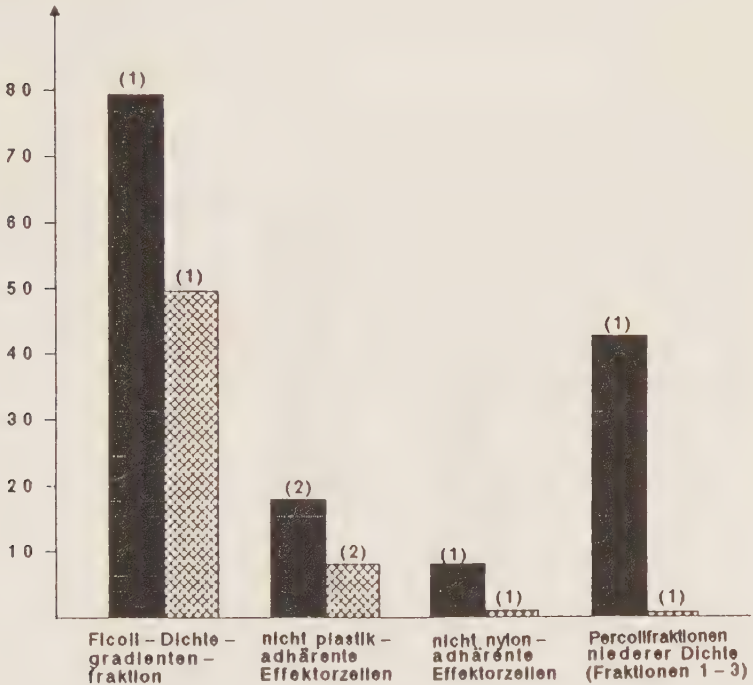
3.2.1.3 Veränderung der effektorzellvermittelten

Zytotoxizität durch in vitro-Kultur

Um zu überprüfen, ob sich die Tumorzell-Attacke durch isolierte Hundeeffektorzellen (s. 3.1.5.1) nach in vitro-Inkubation der Effektorzellen verändert, wurde für vier verschiedene Effektorzellfraktionen (im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierte Zellen, nicht plastik- bzw. nicht nylonadhärente Zellen sowie Zellen der Percollfraktionen niederer Dichte) der ^{51}Cr -Test sowohl am Tag der Isolierung als auch nach 24 Stunden Inkubation der Effektorzellen im CO_2 -Brutschrank (37°C) durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß die spontane zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) durch 24-stündige Inkubation der Zellen je nach Effektorzellfraktion um 53% bis 98% abnahm (s. Abb. 3). Der ^{51}Cr -Test wurde daher zur Vermeidung in vitro auftretender Effektorzell-Aktivitätsverluste immer am Tag der Blutentnahme durchgeführt.

Abbildung 3: Gegenüberstellung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität (SCMC) verschiedener Effektorzellfraktionen sofort nach ihrer Isolierung aus Hundeblut sowie nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C im CO₂-Brutschrank

% spez. Lysis
von CTAC



Konstantes Effektor - Zielzellenverhältnis von 30:1

■ = SCMC frisch isolierter Effektorzellen

▨ = SCMC nach Inkubation der Effektorzellen bei 37 °C über 24 h

(n) = Anzahl getesteter Hundeblutproben

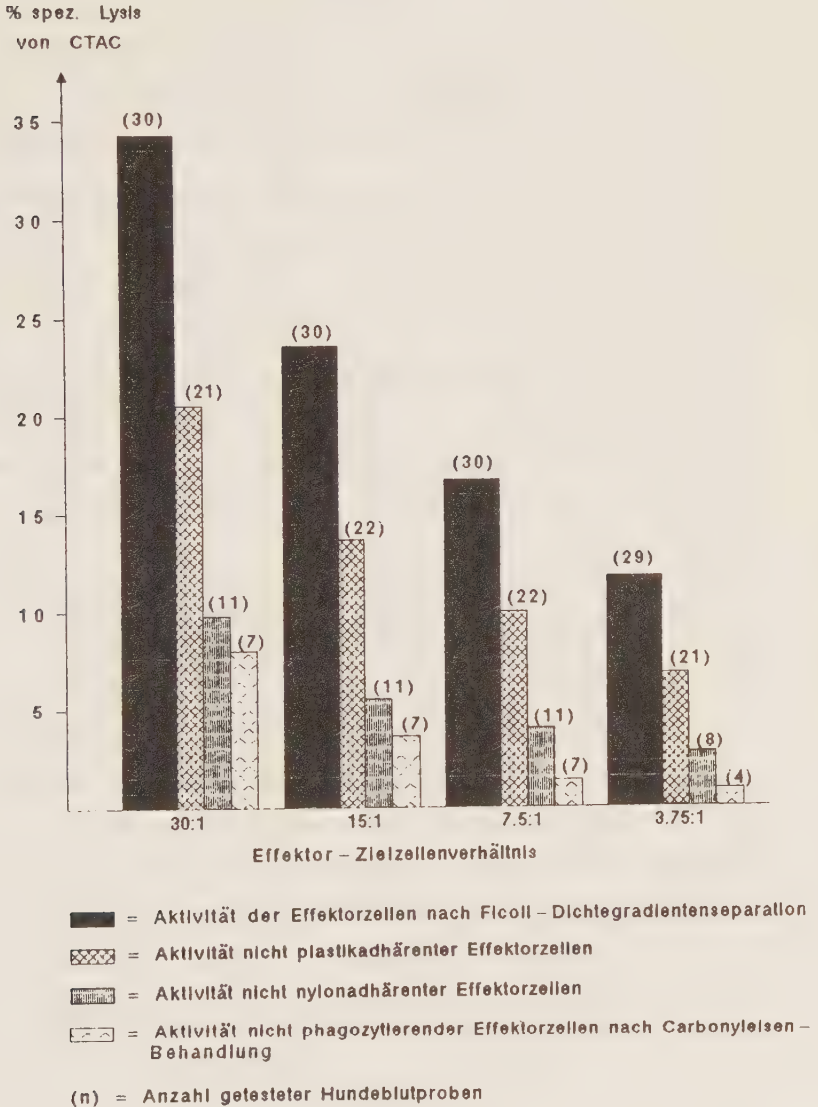
3.2.1 Spontane zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) der separierten Effektorzellfraktionen

Es wurde der Versuch unternommen, über unterschiedliche Methoden der Zellseparation wie Inkubation auf Plastik, Nylonfaser-säule, Carbonyleisenbehandlung und Percoll-Dichtegradienten-zentrifugation die Träger der SCMC des Hundes zu identifizieren.

3.2.2.1 Übersichtsgraphik -----

Zum besseren Überblick wird der Beschreibung der Einzelergebnisse eine Übersichtsgraphik vorangestellt, in der die Auswirkungen der einzelnen Separationsschritte auf die Höhe der im ^{51}Cr -Test gemessenen spontanen zellvermittelten Zytotoxizität zusammenfassend dargestellt sind (s. Abb. 4).

Abbildung 4: Darstellung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität von Effektorzellen aus dem venösen Hundeblut nach Anwendung verschiedener Zell-Trennmethoden



3.2.2.2 SCMC der im Ficoll-Dichtegradientenverfahren

isolierten Effektorzellen

Aus den Blutproben von 30 Hunden wurden über das Ficoll-Dichtegradientenverfahren Effektorzellen isoliert und im ^{51}Cr -Test auf ihre spontane Zytotoxizität gegen CTAC getestet. Zwei der Tiere fungierten zwei- bzw. dreimal als Blutspender. Es zeigte sich, daß die von den Effektorzellen ausgehende spezifische Lysis gegen die Tumorzelllinie CTAC bei dieser von verschiedenen Tieren stammenden Zahl untersuchter Blutproben individuell stark variierte. Bei einem Effektor-Zielzellenverhältnis von 30:1 bewegten sich die Werte für die spezifische Lysis der Tumorzellen zwischen 5,9% und 85,9% (s. Anh. Tab. 5). Die Einzelwerte der mehrmals getesteten Blutproben von zwei Tieren unterlagen jedoch keinen derartigen Schwankungen (s. Anh. Tab. 6).

Darüberhinaus wurde für die 30 untersuchten Blutproben eine Häufigkeitsverteilung der SCMC nach Durchführung dieses Dichtegradientenverfahrens ermittelt. Hierzu wurden die Tiere in 5 SCMC-Aktivitätsgruppen von 5,5% bis 83,0% spezifischer Lysis eingeteilt. Es stellte sich heraus, daß 40% der Hunde der untersten Aktivitätsgruppe bis zu 21% spezifischer Lysis zugeordnet werden mußten und runde 80% der untersuchten Tiere unter dem Lysiswert von 52% blieben (s. Tab. 7).

Sehr hohe spezifische Lysiswerte ($\geq 75\%$) im ^{51}Cr -Test erreichten lediglich die Effektorzellen von drei getesteten Hunden.

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der SCMC der Effektorzellen
im peripheren Blut von 30 Hunden nach Durchführung
des Ficoll-Dichtegradientenverfahrens

SCMC-AKTIVITÄTS- GRUPPIERUNG Angabe in % spezif. Lysis	ABSOLUTE KLASSEN- HÄUFIGKEIT n	RELATIVE GRUPPEN- ZUGEHÖRIGKEIT %	RELATIVE SUMMEN- HÄUFIGKEIT %
5,5 - 21	12	40	40
21 - 36,5	6	20	60
36,5 - 52	6	20	80
52 - 67,5	2	6,7	86,7
67,5 - 83	4	13,3	100

n = Anzahl der untersuchten Hundeblutproben

3.2.2.3 SCMC der Effektorzellen nach Inkubation auf Plastik

Die Plastikinkubation der Effektorzellen wurde bei 22 Blutproben im Anschluß an das Ficoll-Dichtegradientenverfahren durchgeführt. Analog zu den dort (s. 3.2.2.2) erhaltenen Ergebnissen, waren auch die spezifischen Lysiswerte der Effektorzellen nach Inkubation in Plastikkulturgefäßen im ^{51}Cr -Test großen Schwankungen unterworfen (s. Anh. Tab. 8, 9, 10). Bei wiederholten Zytotoxizitätsmessungen der Proben von Einzeltieren war jedoch die Variationsbreite der Lysiswerte wesentlich geringer (s. Anh. Tab. 8a, 9a, 10a).

In Abbildung 5 sind die SCMC-Werte der drei durch Plastikinkubation gewonnenen Effektorzellfraktionen zusammenfassend dargestellt.

a) Nicht plastikadhärente Zellen

Verglichen mit den im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen lysierten die nicht plastikadhärenten Zellen, abgesehen von einer Ausnahme, immer eine geringere Anzahl von Zielzellen.

Die durch nicht plastikadhärente Zellen im ^{51}Cr -Test erzielten Lysiswerte bewegten sich bei einem Effektor-Zielzellenverhältnis von 30:1 zwischen 2,4% und 44,6%. Sie lagen damit durchwegs niedriger als die der leicht sowie die der stark plastikadhärenten Effektorzellen (s. Abb. 5).

Die einzelnen Lysiswerte der nicht plastikadhärenten Effektorzellen sind aus den Tabellen 8 und 8a im Anhang

ersichtlich.

b) Leicht plastikadhärente Zellen

Die "leicht plastikadhärenten Zellen" lysierten im ^{51}Cr -Test in den untersuchten Effektor-Zielzellenverhältnissen um 15% bis 23% mehr Tumorzellen als die nicht plastikadhärenten Zellen (s. Abb. 5).

Im Einzelnen sind die Lysiswerte dieser Effektorzellfraktion den Tabellen 9 und 9a im Anhang zu entnehmen.

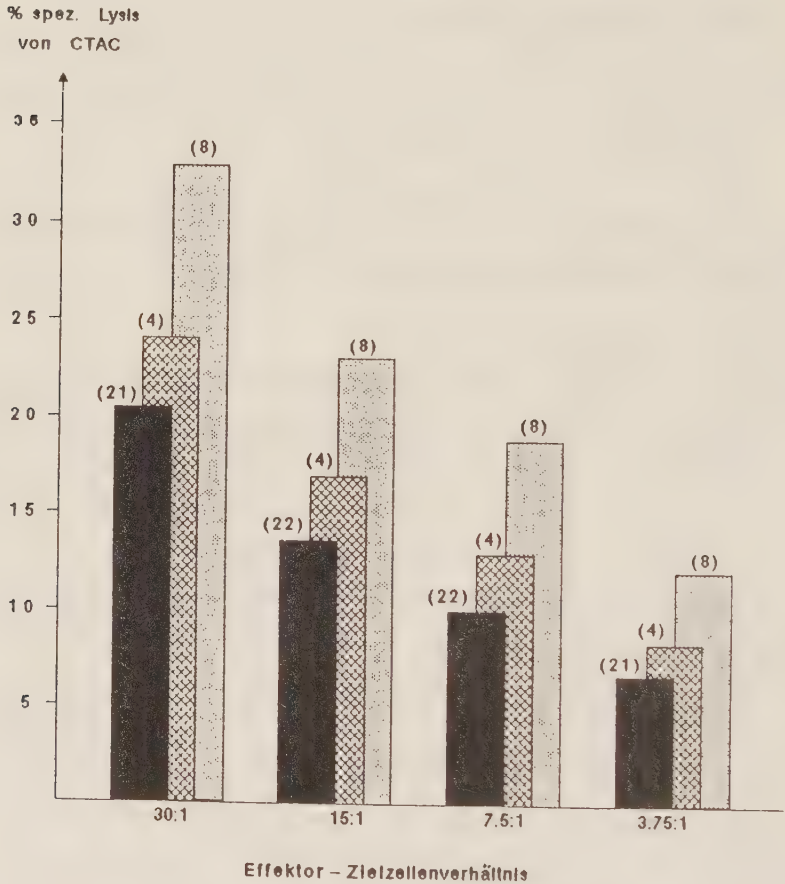
c) Stark plastikadhärente Zellen

Am effektivsten wurden die Zielzellen im ^{51}Cr -Test durch stark plastikadhärente Effektorzellen lysiert. In allen vier getesteten Effektor-Zielzellenverhältnissen übertrafen die Lysiswerte der stark plastikadhärenten Zellen jene der nicht adhärenten um 37% bis 47%.

Auch die Zytotoxizität der leicht adhärenten Zellen wurde im Mittel um 30% übertroffen (s. Abb. 5).

Die genauen spezifischen Lysiswerte sind in den Tabellen 10 und 10a im Anhang zusammengefaßt.

Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität der drei durch Plastikinkubation gewonnenen Effektorzellfraktionen



- = Aktivität der nicht plastikadhärenten Effektorzellen
- ▨ = Aktivität der leicht plastikadhärenten Effektorzellen
- ▤ = Aktivität der stark plastikadhärenten Effektorzellen

(n) = Anzahl getesteter Hundeblutproben

3.2.2.4 SCMC der Effektorzellen nach Behandlung ----- mit Carbonyleisenpulver -----

Nach Abtrennung der phagozytosefähigen Zellen des Hundeserums mit Hilfe von Carbonyleisenpulver war gegenüber den im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen (s. 3.2.2.2) eine Reduktion der spontanen Zytotoxizität nicht phagozytischer Zellen um 77% (Effektor-Zielzellenverhältnis 30:1) bis 92% (Effektor-Zielzellenverhältnis 7,5:1 bzw. 3,75:1) festzustellen. Selbst die nicht plastikadhärenten Zellen (s. 3.2.2.3 a) lagen in ihrer spontanen Zytotoxizität noch um 61-87% höher als die nach Carbonyleisenbehandlung verbliebenen nicht phagozytierenden Zellen.

Wurden diese ohnehin nur wenig zytotoxischen Effektorzellen zusätzlich noch auf eine Nylonfasersäule gegeben, so besaßen die Zellen des Eluates keine im ^{51}Cr -Test gegen CTAC meßbare Zytotoxizität mehr.

Aufgrund der nur geringen Tumorzelllyse, die durch die von carbonyleisenphagozytierenden Zellen abgetrennten Effektorzellen erzielt werden konnte, war auch die Schwankungsbreite der gemessenen Einzelwerte, verglichen mit den übrigen Effektorzellfraktionen sehr niedrig (vgl. 3.2.2.2, 3.2.2.3, 3.2.2.5). Bei einem Effektor-Zielzellverhältnis von 30:1 bewegten sich die Werte lediglich in einem Bereich von 3,8% bis 12,2%.

Aus Abbildung 4 (s. 3.2.2.1) sind die Zytotoxizitätsunterschiede einzelner Effektorzellfraktionen ersichtlich.

Die Tabellen 11 und 11a im Anhang enthalten die genauen Effektorzellaktivitätswerte (% spezifische Lysis) im ^{51}Cr -Test nach Abtrennung carbonyleisenphagozytierender Zellen.

3.2.2.5 SCMC der Effektorzellen nach Inkubation ----- auf Nylonfasersäule -----

Während der zahlreichen Einzelschritte, die zur Separation von zytotoxischen Effektorzellen aus Hundeblut führen sollten, ging ein unterschiedlich großer Anteil der ursprünglich in der verfügbaren Blutmenge enthaltenen potentiell zytotoxischen Zellen verloren. Deshalb konnte die weitere Auftrennung der Effektorzellen über die Nylonfasersäule und den Percoll-Dichtegradienten (s. 3.2.2.6) nur bei einem Teil der untersuchten Tiere durchgeführt werden.

a) Nicht nylonadhärente Zellen

Von insgesamt 11 Tieren wurden nicht plastikadhärente Effektorzellen auf Nylonfasersäulen gegeben und die spontane Zytotoxizität der Zellen des Eluats im ^{51}Cr -Test gegen CTAC gemessen.

Die aus den gewonnenen Einzelwerten errechneten mittleren Lysiswerte lagen für alle untersuchten Effektor-Zielzellenverhältnisse nur unwesentlich höher als jene nach Carbonyleisenbehandlung (s. 3.2.2.4). Bei vier Einzelmessungen war nach Separation über die Nylonfasersäule keinerlei zytotoxische Aktivität der eluierten Effektorzellen mehr nachzuweisen.

Bei Hunden mit hoher Zytotoxizität in der nicht nylonadhä-

renten Effektorzellfraktion (> 15%) erzielten in der Regel auch die nicht plastikadhärenten bzw. die über das Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen überdurchschnittlich hohe spezifische Lysiswerte im ^{51}Cr -Test.

Die bereits bei anderen Effektorzellfraktionen (s.3.2.2.2 und 3.2..2.3) gemachte Beobachtung, daß wiederholte Einzelmessungen am selben Tier jeweils ähnliche Werte für die Höhe der Zytotoxizität ergaben, traf auch für diese Fraktion zu (s. Anh. Tab. 12 a).

Die spezifischen Lysiswerte nicht nylonadhärenter Effektorzellen sind den Tabellen 12 und 12 a im Anhang zu entnehmen.

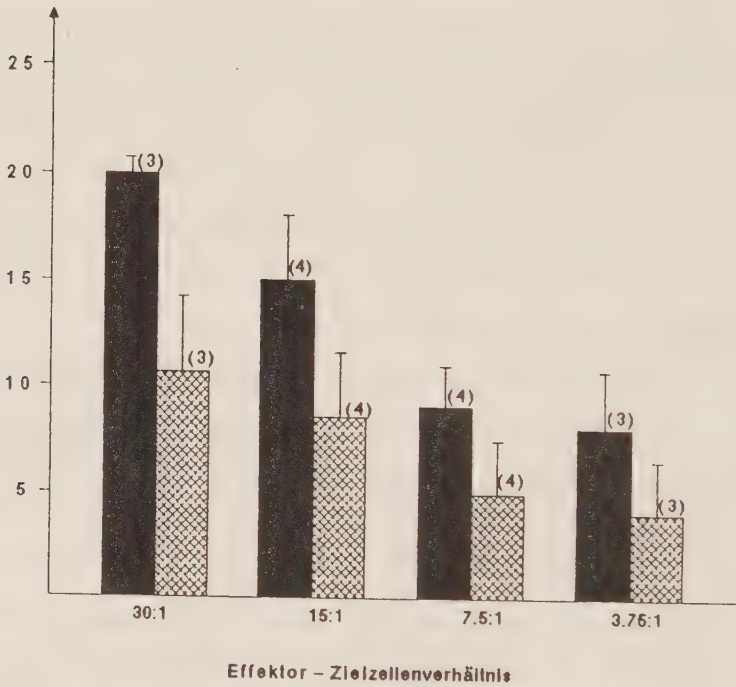
b) Nylonadhärente Zellen

Bei 4 Tieren wurden zusätzlich die zytotoxischen Fähigkeiten nylonadhärenter Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die der Nylonwatte anhaftenden Zellen, verglichen mit den nicht adhärenten, im ^{51}Cr -Test eine um 36% bis 48% höhere Zytotoxizität besaßen.

Zur besseren Anschaulichkeit wird auf Abbildung 6 verwiesen. Spezifische Lysiswerte sowohl nylonadhärenter als auch nicht nylonadhärenter Zellfraktionen sind in Tabelle 13 im Anhang aufgelistet.

Abbildung 6: Vergleich der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität (SCMC) nylonadhärenter Zellen mit der SCMC nicht nylonadhärenter Zellen

% spez. Lysis
von CTAC



■ = Aktivität nylonadhärenter Effektorzellen

▨ = Aktivität nicht nylonadhärenter Effektorzellen

Die Linien über den Balken geben den Standardfehler an.

(n) = Anzahl getesteter Hundeblutproben

3.2.2.6 SCMC der im diskontinuierlichen Percoll-

Dichtegradienten isolierten Effektorzellen

Die Anreicherung hoch zytotoxischer Effektorzellen in den Fraktionen niederer Dichte des Percoll-Gradienten gelang in vier Versuchen.

Beim ersten der durchgeführten Versuche wurden nicht plastikadhärente Zellen auf den Dichtegradienten gegeben. Die in den Fraktionen niederer Dichte (Fraktionen 1-3) des Percoll-Dichtegradienten angereicherten Effektorzellen wiesen eine um 23% höhere Zytotoxizität auf als die nicht plastikadhärenten Zellen.

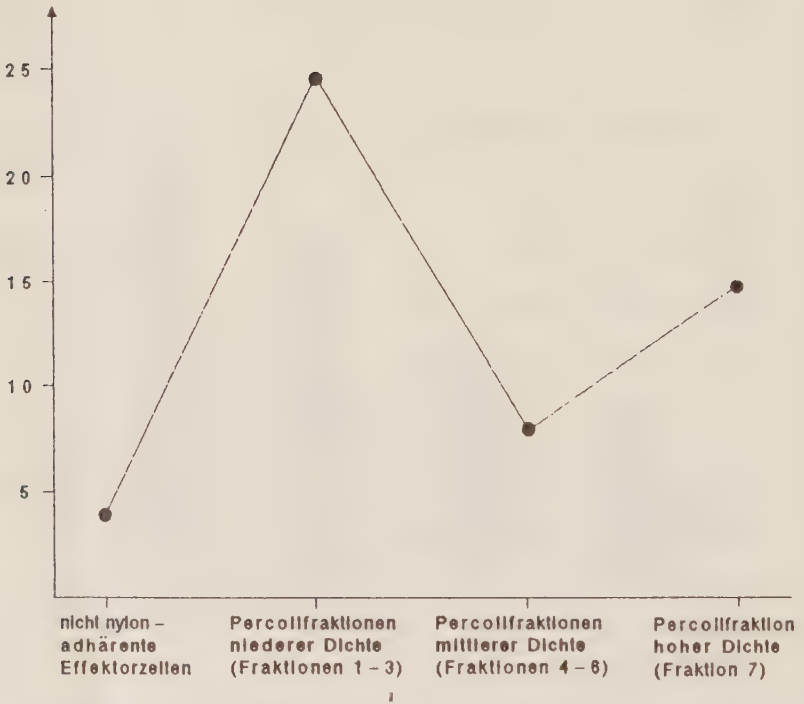
Drei weitere Versuche wurden mit nicht an Nylonwatte anhaftenden Zellen des Tieres N 909 vorgenommen. Verglichen mit dieser Ausgangsfraktion niedriger Zytotoxizität, fand in den gepoolten (s. 3.1.3.5) Percollfraktionen 1-3 eine immense Anreicherung zytotoxischer Zellen statt. Diese erzielten im ^{51}Cr -Test gegen CTAC eine um 75-100% höhere spezifische Lysis der Zielzellen als die nicht nylonadhärenten Zellen.

Die genauen Ergebnisse der einzelnen Versuche enthält Tabelle 14 im Anhang.

Aus der Abbildung 7 ist die Anreicherung spontan zytotoxischer Zellen des Hundes N 909 in den Zellfraktionen niederer Dichte (Fraktionen 1-3) im diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten ersichtlich.

Abbildung 7: Anstieg der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität der Effektorzellen des Tieres N 909 nach Anreicherung in den Fraktionen niederer Dichte des diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten (n=3)

% spez. Lysis
von CTAC



Konstantes Effektor - Zielzellenverhältnis von 30:1

(n) = Anzahl getesteter Hundeblutproben

3.2.3 Nachweis der Existenz und Wirksamkeit löslicher zytotoxischer Faktoren

Die aus verschiedenen Effektorzellfraktionen durch Inkubation mit CTAC-Tumorzellen gewonnenen zellfreien Überstände (s. 3.1.4) wurden im ^{51}Cr -Test gegen CTAC auf ihre potentielle Zytotoxizität hin überprüft. Tatsächlich wurden die Zielzellen durch 18-stündige Inkubation mit den zellfreien Überständen teilweise lysiert. Da die Überstände vor der Zytotoxizitätsmessung durch 0,22 μm -Filter filtriert worden waren, konnte davon ausgegangen werden, daß die Tumorzellysis nicht durch zelluläre Elemente, sondern durch in den Überständen enthaltene zytotoxische Faktoren bewirkt worden war.

Die Mediumkontrollen waren in allen durchgeführten Versuchen negativ, d.h. es wurde im ^{51}Cr -Test keine Zielzellysis durch Überstände von Effektorzellen oder Tumorzellen, die allein in Medium inkubiert wurden, erzielt.

Im folgenden wurde die Wirkung zellfreier zytotoxischer Überstände auf die allogenen Thyreoidea-Adenokarzinomzellen näher untersucht.

3.2.3.1 Kinetik der Tumorzellysis durch zytotoxische Faktoren

Analog zum Vorgehen bei den Effektorzellen (s. 3.2.1.2) wurde auch für die zytotoxischen Faktoren geprüft, welche Folgen eine Erhöhung der Inkubationsdauer des ^{51}Cr -Tests von 4 Stunden auf 18 Stunden für die gemessenen Zytotoxizitätswerte haben würde.

Unabhängig von der Effektorzellfraktion, mit der die jeweiligen Überstände produziert worden waren, ergaben sich bei einer Testdauer von 4 Stunden nur vernachlässigbar kleine Lysiswerte durch zytotoxische Faktoren.

Im Gegensatz dazu wurde während der 18-stündigen Testdauer ca. ein Drittel der Tumorzellen durch Zugabe von jeweils 100 Volumenprozent der Überstände zu den Zielzellen lysiert.

Wie bereits bei den Effektorzellen (s. 3.1.1.2), so wurde auch hier eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen. Die Anzahl der lysierten Tumorzellen sank mit steigender Verdünnung der zytotoxischen Überstände.

Die genauen Lysiswerte sowie eine graphische Darstellung zeigen Tabelle 15 im Anhang bzw. Abbildung 8.

3.2.3.2 Tumorzellzytotoxizität der produzierten Überstände

Die im ^{51}Cr -Test eingesetzten Überstände waren von vier verschiedenen Effektorzellfraktionen produziert worden. Hierbei handelte es sich um im Ficoll-Dichtegradienten isolierte Effektorzellen, um nicht bzw. stark plastikadhärente Zellen sowie um nicht nylonadhärente Zellen.

Nach Durchführung des Percoll-Dichtegradienten war die erhaltene Zellzahl in den Fraktionen 1-3 (2,5-5,5% der im Ficoll-Dichtegradienten isolierten Zellen) jeweils zu gering, um zusätzlich Überstände produzieren zu können.

Die aus der Fraktion der stark plastikadhärenten Zellen nach Inkubation mit CTAC-Tumorzellen gewonnenen zellfreien Überstände hatten die bei weitem höchste Zytotoxizität gegen CTAC-

Zielzellen. Die erzielten Lysiswerte lagen bei einer Zugabe von 100 Volumenprozent des jeweiligen Überstandes zum Test um 35% bis 42% höher als die der Überstände von im Ficoll-Dichtegradienten isolierten bzw. von nicht plastikadhärenten Zellen. Überstände, die mit nicht nylonadhärenten Zellen produziert worden waren, wiesen die niedrigste Zytotoxizität auf und lysierten 78% weniger CTAC-Zielzellen als die Überstände der stark plastikadhärenten Zellen. Bei Einsatz unterschiedlicher Volumenanteile an Überständen im ^{51}Cr -Test fiel auf, daß selbst ein Viertel des ursprünglich eingesetzten Volumens an Überstand noch eine beträchtliche Lysis der CTAC-Tumorzellen bewirken konnte. So lagen die spezifischen Lysiswerte bei Zugabe von 25 Vol.% Überstand im Durchschnitt in allen Fraktionen nur ca. 30% niedriger als bei Einsatz von 100 Vol.% desselben Überstandes.

Abbildung 9 gibt diese zytotoxische Wirkung der zellfreien Überstände in Abhängigkeit vom eingesetzten Überstand-Volumen wieder.

Die durch die verschiedenen Überstände erzielten spezifischen Lysiswerte sind in den Tabellen 16 - 16 c im Anhang enthalten.

Abbildung 8: Kinetik der Tumorzelllysis (CTAC) durch zytotoxische Faktoren im Chromium 51-Freisetzungstest

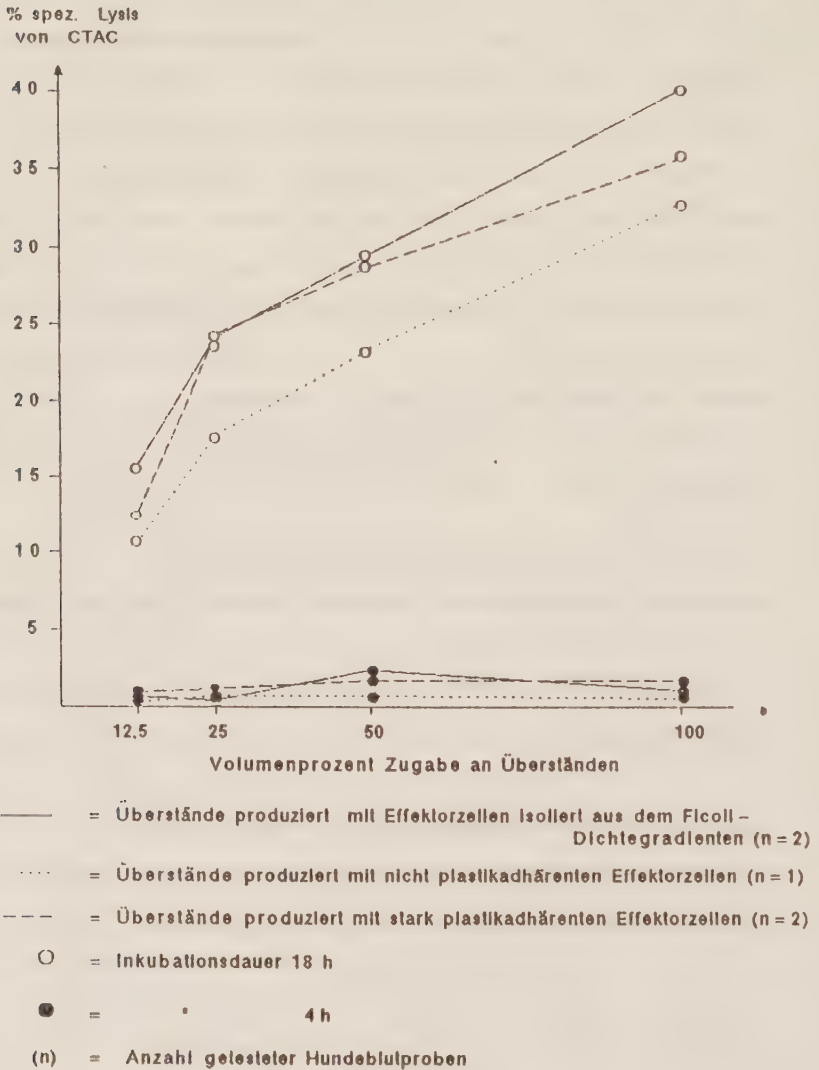
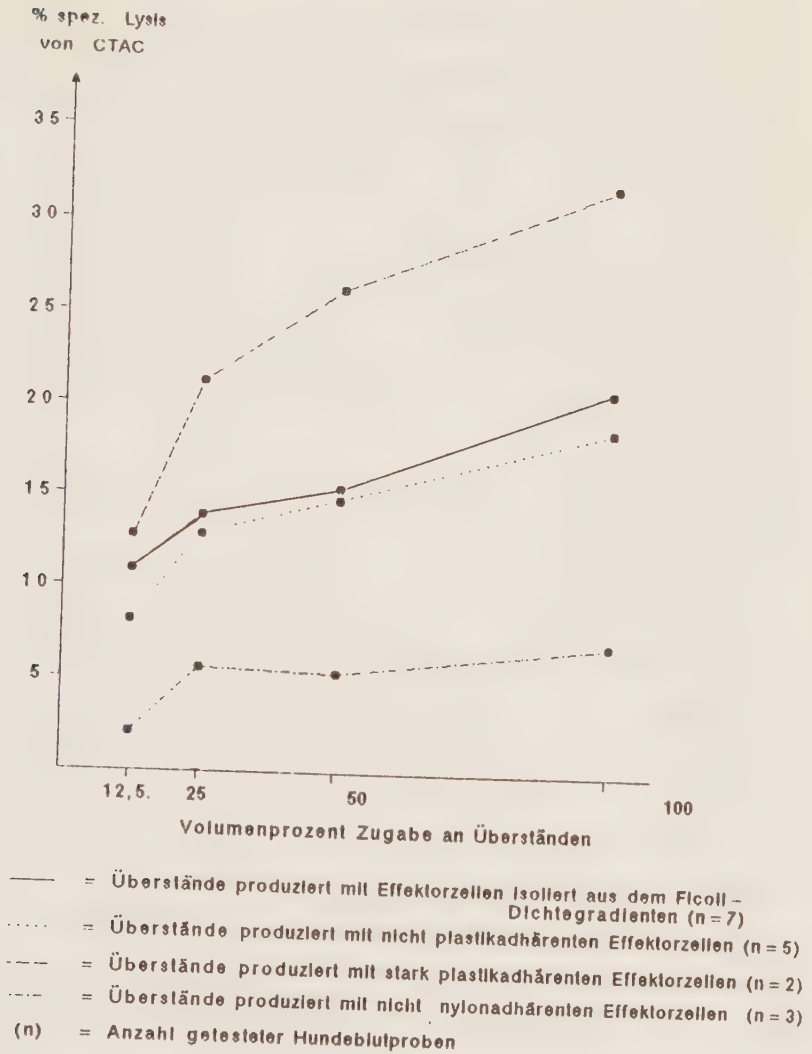


Abbildung 9: Zielzelllysis nach 18 h-Inkubation bei 37°C durch zytotoxische Überstände, produziert mit verschiedenen Effektorzellfraktionen



3.2.3.3 Korrelation zur effektorzellvermittelten Zytotoxizität

Nachdem sowohl die Zytotoxizität der verschiedenen Effektorzellfraktionen als auch die der von ihnen produzierten zytotoxischen Faktoren bekannt war, wurde untersucht, ob zwischen den jeweiligen spezifischen Lysiswerten eine Korrelation bestand.

Bei Betrachtung der aus den Tabellen 17, 17 a und 17 b im Anhang errechneten Mittelwerte fiel auf, daß die Zytotoxizität der zellfreien Überstände nach Effektor-Tumorzell(CTAC)-Interaktion niedriger lag als die entsprechende direkte Effektorzellwirkung.

Hierbei lysierten die Überstände von im Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen um 22,3% weniger Tumorzellen als am Vortag die Effektorzellen desselben Gradienten. Überstände von nicht plastikadhärenten Zellen zerstörten 27,5% weniger Tumorzellen, jene von nicht nylonadhärenten Zellen 34,3% weniger als die entsprechenden Effektorzellfraktionen.

Bei den stark plastikadhärenten Zellen ergab sich ein umgekehrtes Bild. Hier waren die zytotoxischen Faktoren in der Lage, 61,2% mehr CTAC zu lysieren als die vorher getesteten Effektorzellen (s. Tab. 17 c).

Für die angegebenen Mittelwerte wurde die Berechnung des Korrelationskoeffizienten angestellt, wobei sich ein Wert von 0,66 ergab. Bei Berücksichtigung sämtlicher Einzelwerte aus den Tabellen 17 - 17 c im Anhang verringerte sich dieser Wert auf 0,469. Zwischen der Zytotoxizität der Effektorzellen und der

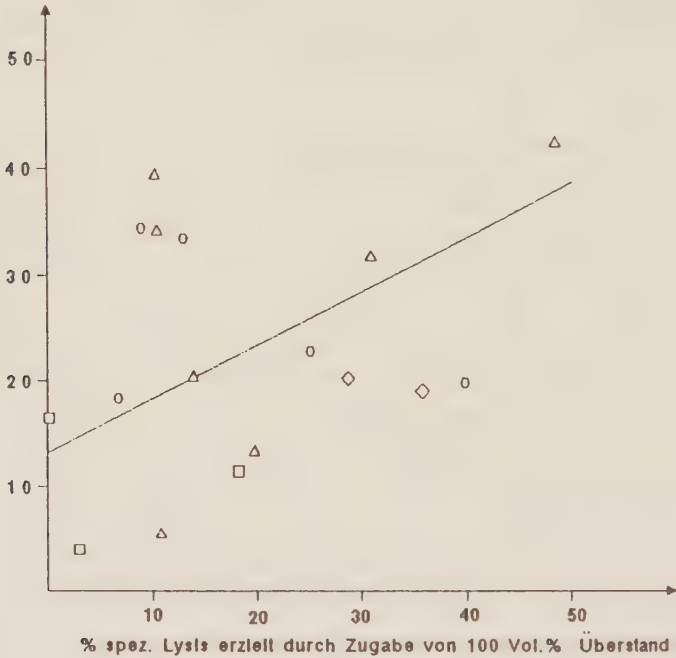
durch zytotoxische Faktoren vermittelten scheint also eine positive Korrelation zu bestehen.

Abbildung 10 zeigt ein Streudiagramm, in das sämtliche gemessenen Zytotoxizitätswerte der Tabellen 17 - 17 c eingetragen sind.

Abbildung 10: Streudiagramm der SCMC verschiedener Effektorzellfraktionen und der zytotoxischen Überstände, produziert aus denselben Effektorzellen

% spez. Lysis von CTAC

erzielt durch 3×10^6 Effektorzellen



△ = Effektorzellfraktion nach Ficoll-Dichtegradientenverfahren

○ = nicht plastikhärente Effektorzellen

□ = nicht nylonadhärente Effektorzellen

◇ = stark plastikhärente Effektorzellen

3.2.4 Weitere Charakterisierung der SCMC beim Hund

3.2.4.1 Reduktion der SCMC durch Effektorzellbehandlung mit dem anti-asialo GM 1 Antikörper

Für vier verschiedene Effektorzellfraktionen wurde der Einfluß einer Behandlung der Effektorzellen mit anti-asialo GM 1 Antikörper auf die SCMC untersucht.

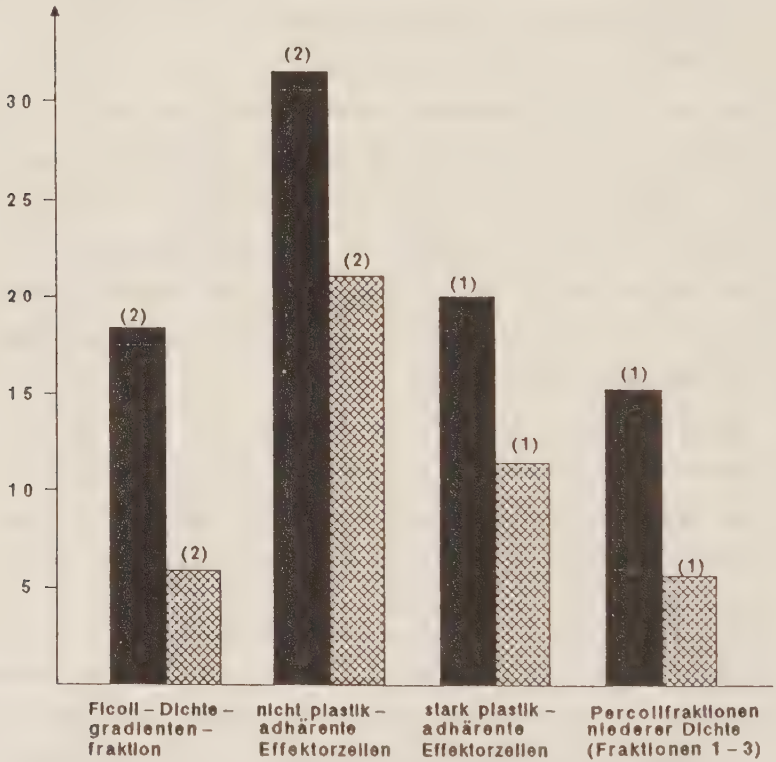
Die im ^{51}Cr -Test gemessenen spezifischen Lysiswerte gingen nach Inkubation der Effektorzellen mit dem Antikörper um mindestens 30% zurück. Am stärksten war die Reduktion für die Percollfraktionen 1-3 und die im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen (64% - 70%). Von den nicht bzw. stark plastikadhärenten Zellen wurden im Anschluß an die Antikörperbehandlung ca. 40% weniger Zielzellen lysiert.

Bei wiederholten Experimenten ergaben sich immer verschieden starke Aktivitätsverluste der Effektorzellen, die jedoch keineswegs zu der bei der Behandlung von Mäuse-NK-Zellen beobachteten nahezu völligen Aufhebung einer SCMC (114) führten.

Die Reduktion der zytotoxischen Aktivität einzelner Effektorzellfraktionen ist in Tabelle 18 im Anhang zusammengefaßt. Abbildung 11 zeigt die Auswirkungen der Antikörperbehandlung auf 4 verschiedene Effektorzellfraktionen im Überblick.

Abbildung 11: Reduktion der spontanen zellvermittelten Zytotoxizität des Hundes durch den anti-asialo GM 1 Antikörper

% spez. Lysis
von CTAC



Konstantes Effektor - Zielzellenverhältnis von 30:1

■ = Effektorzellen + Komplement

▨ = Effektorzellen + anti-asialo GM 1 + Komplement

(n) = Anzahl getesteter Hundeblutproben

3.2.4.2 Reduktion der SCMC durch Effektorzellbehandlung

mit L-Leucin Methylester (LeuOMe)

Die Behandlung mit dem lysosomotropen Agens L-Leucin Methyl-
ester wurde an den drei folgenden Effektorzellfraktionen vorge-
nommen: an nicht plastik- bzw. nicht nylonadhärenten Zellen
sowie an den Zellen der Percollfraktionen 1-3.

Die zuletzt angeführte Effektorzellfraktion konnte nur einmal
mit LeuOMe behandelt werden, da es während der Durchführung der
vier Separationsschritte zu großen Zellverlusten kam. Die
Zellzahl der Percollfraktionen 1-3 betrug günstigstenfalls 5%
der im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Zellen.

Bei den LeuOMe-behandelten Fraktionen war durchwegs eine dosis-
abhängige Reduktion der spezifischen Lysiswerte im ^{51}Cr -Test
festzustellen. Nach 30-minütiger Inkubation der Effektorzellen
mit 40 mM-LeuOMe ging die SCMC der nicht plastikadhärenten
Zellen um 62,1%, die der nicht nylonadhärenten Zellen um 82,9%
und die der Zellen aus den Percollfraktionen 1-3 sogar um 94,9%
zurück.

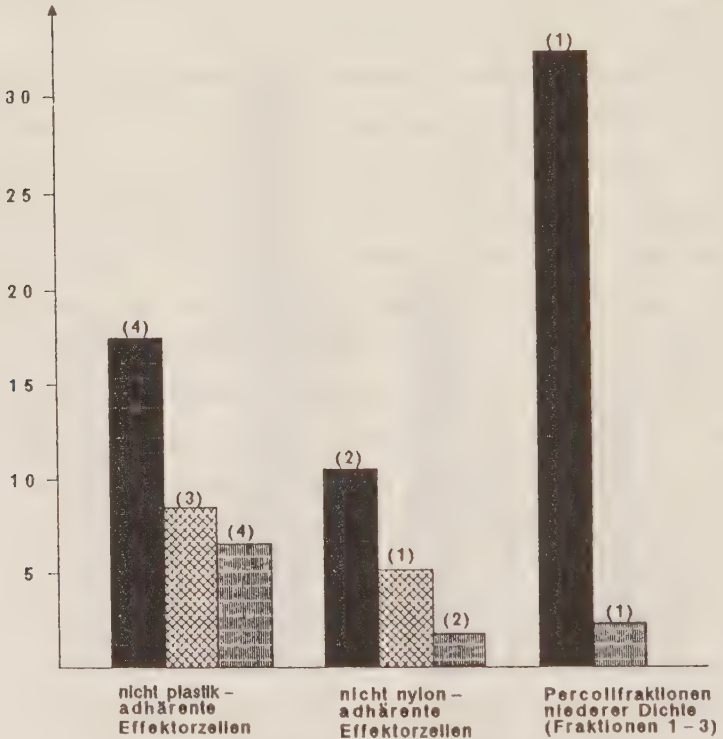
Die beiden ersten Fraktionen wurden zusätzlich mit 20 mM-LeuOMe
behandelt, wodurch sich bei beiden die Zielzelllysis um rund 51%
verminderte. Die Höhe der gemessenen SCMC bezog sich jedesmal
auf ein Effektor-Zielzellenverhältnis von 30:1.

Die Einzelergebnisse der vorgenommenen LeuOMe-Behandlungen
sind Tabelle 19 im Anhang zu entnehmen.

Abbildung 12 zeigt den Einfluß der LeuOMe-Behandlung auf die
im ^{51}Cr -Test meßbare SCMC verschiedener Effektorzellfraktionen.

Abbildung 12: Einfluß der LeuOMe-Behandlung verschiedener Effektorzellfraktionen auf die im Chromium 51-Freisetzungstest gemessene spontane zellvermittelte Zytotoxizität

% spez. Lysis
von CTAC



Konstantes Effektor - Zielzellenverhältnis von 30:1

■ = Effektorzellen + Medium

▨ = Effektorzellen + LeuOMe 20 mM

▤ = Effektorzellen + LeuOMe 40 mM

(n) = Anzahl getesteter Hundebloodproben

3.2.4.3 Zusammensetzung der Effektorzellfraktionen

Um die aus den verschiedenen ^{51}Cr -Tests erhaltenen Ergebnisse deuten und bewerten zu können, war es erforderlich, die Zusammensetzung der separierten Effektorzellfraktionen näher zu untersuchen.

Im Gegensatz zu dem von BØYUM (4) beschriebenen Verfahren für das Humanblut, gelingt die Abtrennung mononukleärer Leukozyten aus dem Hundeblut über das Dichtegradientenverfahren nicht immer. Aufgrund ungeklärter, vorübergehender Änderungen in der mittleren Dichte neutrophiler Granulozyten beim Hund, sind sich die Dichten mononukleärer Leukozyten und polymorphonukleärer Zellen zeitweise so ähnlich, daß eine saubere Trennung im Dichtegradientenverfahren nicht möglich ist (13).

Deshalb wurden mit Hilfe zytochemischer Methoden Effektorzellausstriche untersucht, um festzustellen ob nach Hintereinanderschaltung verschiedener Separationsschritte die Trennschärfe einzelner Methoden für periphere Hundeblutzellen hinreichend gut war, d.h. ob homogene Effektorzellfraktionen geschaffen wurden, und aus welchen Zellen diese im Einzelnen bestanden.

a) Peroxidasereaktion

Anhand der Peroxidasefärbung wurde versucht, den Anteil der Monozyten und Granulozyten in den Effektorzellfraktionen darzustellen.

Dies geschah durch Darstellung der Peroxidaseaktivität in den Primärgranula von Monozyten sowie neutro- und eosino-

philen Granulozyten.

Peroxidase-positive Granula zeigten sich als unterschiedlich große, blau-schwarze Flecke in rotem Zytoplasma.

Granulozyten färbten sich in der Regel kräftig an und besaßen ein fast schwarzes Zytoplasma, während Monozyten oft nur wenige peroxidase-positive Granula aufwiesen.

Lymphozyten dagegen waren durchwegs peroxidase-negativ und somit sowohl Zellkern als auch Zytoplasma orange-rötlich angefärbt.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der gefärbten Ausstriche wurden jeweils 400 Zellen gezählt und der Anteil peroxidase-positiver Zellen prozentual ausgedrückt.

Es stellte sich heraus, daß der Anteil peroxidase-positiver Zellen an der Gesamtfraktion gleich nach Durchführung des Ficoll-Dichtegradientenverfahrens mit rund 29,1% am höchsten war. Nach jedem einzelnen Separationsschritt zur Lymphozytenisolierung nahm er jedoch kontinuierlich ab, so daß man bei den im Percoll-Dichtegradienten isolierten Fraktionen 1-3 von einer reinen Lymphozytenfraktion ausgehen konnte (Anteil peroxidase-positiver Zellen < 2%). Dagegen war bei der Fraktion stark plastikadhärenter Zellen der Anteil peroxidase-negativer Zellen verschwindend gering (< 5%). Diese Fraktion mußte sich also aus Granulozyten und Monozyten zusammensetzen.

Der Anteil peroxidase-negativer, basophiler Granulozyten an den einzelnen Fraktionen war so verschwindend gering, daß er bei der Auswertung vernachlässigt werden konnte.

Die Ergebnisse der Peroxidasefärbung sind in Tabelle 20 wiedergegeben.

b) Lymphoide Zellen

Zur genaueren Beurteilung der lymphoiden Zellen wurden nach Pappenheim gefärbte Ausstriche nicht nylonadhärenter Fraktionen sowie der Percollfraktionen 1-3 mit Ölimmersion betrachtet. Unter den Zellen dieser annähernd rein lymphoiden Zellpopulationen waren Unterschiede in Morphologie und Zellgröße festzustellen.

So konnte zwischen kleinen, mittleren und großen Lymphozyten unterschieden werden, wovon die kleinen und mittelgroßen Zellen typische Lymphozytenmorphologie aufwiesen mit einem runden, sehr chromatinreichen und stark angefärbten Zellkern, der umgeben war von einem schmalen, häufig kaum sichtbaren, blaßblauen Zytoplasmasaum.

Die großen Lymphozyten dagegen besaßen nierenförmige, exzentrisch liegende Zellkerne mit einem für Lymphozyten hohen Verhältnis zwischen Zytoplasma- und Kernvolumen. Ihr zartblaues Zytoplasma zeichnete sich, zumeist auf der Höhe einer leichten Einziehung des Zellkerns, durch eine auffällige Granulierung aus. Diese dunkelblauen bis rötlichen, azurophilen Granula kamen in relativ geringer Anzahl vor, verglichen mit den eosinophilen Granulozyten und Monozyten des Hundes. Sie waren außerdem kleiner als die in den zuletzt genannten Zellen vorkommenden Granula.

Die in den separierten Lymphozytenfraktionen entdeckten,

großen granulierten Lymphozyten des Hundes entsprachen den zuerst von TIMONEN et al.(99) beschriebenen "large granular lymphocytes" (LGL) des Menschen.

Abbildung 13 zeigt eine schematische Darstellung von LGL des Hundes.

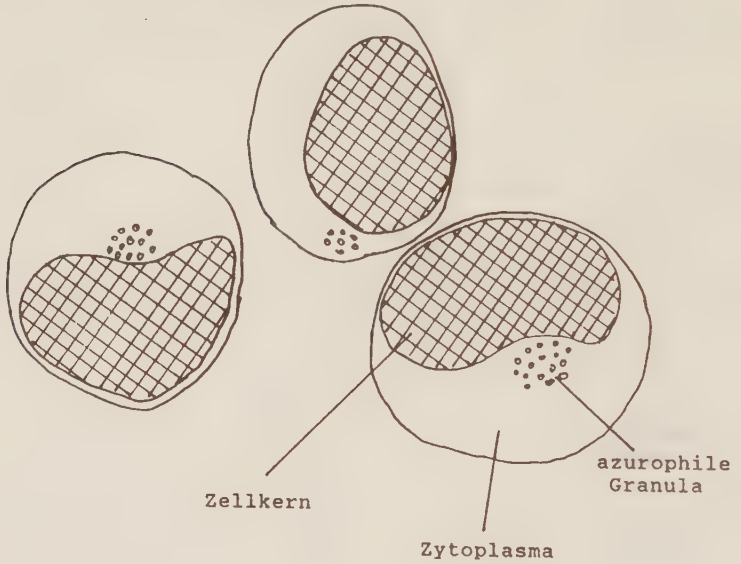
Tabelle 20: Anteil peroxidase-positiver bzw. -negativer Zellen
an den verschiedenen Effektorzellfraktionen

EFFEKTOR- ZELL- FRAKTION	ANFÄRBBARKEIT DER ZELLEN	
	PEROXIDASE-POSITIV	PEROXIDASE-NEGATIV
	$\bar{x} \pm s_e$	$\bar{x} \pm s_e$
nach Ficoll- Dichte- gradienten- verfahren	29,1 $\pm$ 6,6 (5)	70,9 $\pm$ 6,6 (5)
nicht plastik- adhärente Zellen	25,5 $\pm$ 6,9 (5)	74,5 $\pm$ 6,6 (5)
nicht nylon- adhärente Zellen	16,0 $\pm$ 5,5 (5)	84,0 $\pm$ 5,5 (5)
nylon- adhärente Zellen	64,9 (1)	35,1 (1)
stark plastik- adhärente Zellen	95,4 $\pm$ 1,8 (5)	4,6 $\pm$ 1,8 (5)
Percoll- fraktionen 1-3	2,0 (1)	98,0 (1)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler

(n) = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Tiere

Abbildung 13: Schematische Darstellung von im Percolldichte-
gradienten isolierten "large granular lympho-
cytes" (LGL) des Hundes



4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen zur spontanen zellvermittelten Zytotoxizität (SCMC) des Hundes befaßten sich in erster Linie mit den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (51,57,83,84,87). In diese Zellpopulation werden seit ihrer Entdeckung vor 12 Jahren große Erwartungen gesetzt, vor allem hinsichtlich der Tumorphylaxe und -therapie sowie der unspezifischen Abwehr von Viruserkrankungen (29). Es finden sich zwar in der Literatur wiederholt Hinweise auf Beteiligung anderer Leukozytenarten an der SCMC, doch treten diese neben der Erforschung der NK-Zellen eher in den Hintergrund (19,27,31,34,43,62,104).

In der vorliegenden Arbeit konnten mit physikalisch-biologischen Methoden Effektorzellen der SCMC aus dem peripheren Blut des Hundes isoliert und anhand der zur Verfügung stehenden Mittel näher charakterisiert werden. Darüberhinaus wurde der Nachweis für die Beteiligung löslicher zytotoxischer Faktoren am Mechanismus der SCMC des Hundes erbracht. Bei allen getesteten Tieren wurde die vorhandene spontane Zytotoxizität von Blutleukozyten im Chromium 51-Freisetzungstest (^{51}Cr -Test) (9,51) gemessen. Dieser Test wurde trotz bestehender Nachteile wie langer Auswertungsdauer und Problematik des Arbeitens mit Radionukliden gewählt, weil dadurch zum einen ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren möglich wurde und zum anderen die relativ geringen Mengen an verfügbarem Hundeblut eine Gegenüberstellung verschiedener Meßmethoden nicht zuließen. Die von mehreren Autoren sowohl für die Spezies

Hund als auch für alle anderen Haustierarten und den Menschen beschriebene selektive Zielzelllysis durch Effektorzellen der SCMC (51,83,84,87,94) wurde auch in den Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit beobachtet. Mit der allogenen Tumorzelllinie CTAC konnten die höchsten spezifischen Lysiswerte im Chromium 51-Freisetzungstest erzielt werden. Voraussetzung für diese Zielzellaffinität scheint die Interaktion zwischen sogenannten NK-Rezeptoren auf der Effektorzelloberfläche und Strukturen auf der Zielzellmembran zu sein (45). Vermutlich besitzen außer NK-Zellen auch andere Leukozyten diesen Erkennungsrezeptor, da z.B. auch Makrophagen an NK-sensible Zielzellen binden (45). Zur Erzielung signifikanter Zytotoxizitätswerte durch Hundeeffektorzellen waren 16 - 18 Stunden Inkubationsdauer erforderlich. Während dieser Zeit kam es zu einem linearen Anstieg der SCMC gegen die verwendete Tumorzelllinie CTAC. Neben der Länge der Inkubationsdauer war auch das zahlenmäßige Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen für die Höhe der gemessenen Zytotoxizität entscheidend, die proportional zur Zahl der Effektorzellen anstieg.

Nachdem eine 24-stündige in vitro-Inkubation bei 37°C die SCMC der Effektorzellen rapide absinken ließ, kann auch für den Hund die Notwendigkeit eines oder mehrerer Überlebens- bzw. Aktivierungsfaktoren bei der Kultivierung dieser Zellen postuliert werden.

Bei der Isolierung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen aus dem Vollblut des Hundes ergaben sich die bereits von anderen Gruppen beschriebenen Schwierigkeiten (13,42,53,93,

107). Aufgrund ähnlicher Zellgrößen und spezifischer Gewichte war das Ergebnis der Auftrennung in mononukleäre und polymorph-kernige Leukozyten über das Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenverfahren mangelhaft. Eine Verunreinigung isolierter Lymphozyten mit ca. 30% Phagozyten konnte durch zytochemische Anfärbung der peroxidase-positiven Phagozyten nachgewiesen, aber durch Aneinanderreihung verschiedener Separationsmethoden zur Abtrennung adhärenter Zellen größtenteils ausgeglichen werden. Bei der Analyse der Einzelergebnisse muß jedoch die heterogene Zusammensetzung der diversen Effektorzellfraktionen unbedingt mit berücksichtigt werden, da nur so die Ergebnisse des ^{51}Cr -Tests gedeutet werden können.

Ziel der angewandten Separationsmethoden war die Darstellung weitgehend reiner Effektorzellfraktionen mit anschließender Messung der entsprechenden SCMC. Dabei resultierten die angewandten Adhärenzmethoden durchwegs in einer Reduktion der gemessenen zytotoxischen Aktivität nicht adhärenter Zellen sowie in einer Abnahme peroxidase-positiver Zellen in dieser Population. Die geringste Aktivität wurde nach Carbonylisenbehandlung bei den resultierenden, nicht phagozytierenden Zellen beobachtet.

Umgekehrt lag die gemessene spontane Zytotoxizität stark plastikadhärenter sowie nylonadhäsiver Zellen um 40-50% höher als die der entsprechenden nicht adhärenten Fraktion. Gleichzeitig war ein Anstieg "peroxidase-positiver" Zellen zu verzeichnen. In allen Fraktionen zeigte sich eine starke Variation der gemessenen Zytotoxizitätswerte, wobei allerdings nur einzelne

Tiere Höchstwerte erreichten. Das Gros der Hunde wies untere bis mittlere Lysiswerte auf. Wiederholte Messungen an Einzeltieren unterlagen keinen derartigen Schwankungen. Für den Menschen wurde die Fähigkeit zur Ausübung der SCMC als individuelles Charakteristikum beschrieben, das sich unter physiologischen Bedingungen nur wenig ändert (61). Die wenigen wiederholten Messungen der Effektorzellaktivität bei denselben Individuen lassen Ähnliches für den Hund vermuten.

Die auffällige Korrelation zwischen der Depletion von Phagozyten und dem Rückgang der nachweisbaren SCMC bzw. der Anreicherung adhärenter Zellen bei gleichzeitiger Zunahme der Zielzelllysis steht im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen bei Mensch und Labortieren. Für Hund (84) und Katze (102) wurde zwar eine etwa 30%-ige Reduktion der SCMC nach Durchführung der Plastikadhärenz beschrieben, die Autoren gingen jedoch entweder nicht näher auf dieses Phänomen ein (102) oder machten den Abfall des vorher von Monozyten produzierten gamma-Interferons dafür verantwortlich (84).

Dagegen nimmt die SCMC von Effektorzellen des peripheren Blutes anderer Tierarten (z.B. Maus, Schwein) und des Menschen nach weitgehender Abtrennung der Monozyten und Granulozyten zu. Bei diesen Spezies läßt sich die höchste zytotoxische Aktivität bei isolierten, hoch gereinigten NK-Zellen (LGL) nachweisen. In einigen Versuchen konnten in Percollfraktionen niederer Dichte Lymphozyten des Hundes mit LGL-Morphologie isoliert werden. Sie waren um ein Vielfaches zytotoxischer als die Fraktion nicht nylonadhärenter Zellen aus der sie angereichert wurden.

Diese Ergebnisse können als Beweis für die Existenz von NK-Zellen beim Hund gewertet werden, wie er früher bereits von LOUGHRAN et al. (57) erbracht worden war.

Bisher stehen keine sicheren Methoden zur Verfügung, die es erlauben entsprechende Effektorzellarten der SCMC des Hundes in völlig reiner Form aus dem Blut zu isolieren. Während zur Depletion der verschiedenen humanen und murinen Effektorzellen eine Palette monoklonaler Antikörper benutzt werden kann, muß man sich bei der Separation von Hundeleukozyten noch mit ungenaueren, physikalischen Auftrennmethoden begnügen.

Von den angewandten Separationsmethoden wird am ehesten die Percoll-Dichtegradientenzentrifugation dem Anspruch gerecht, eine Effektorzellart (LGL) weitgehend rein darzustellen. Sie erfordert jedoch ein hohes Ausgangsvolumen (≥ 20 ml) an Spenderblut, um beim Hund ausreichend vorgereinigte Lymphozyten zu erhalten. Durch zytochemische Anfärbung konnte hier eine reine Lymphozytenpopulation nachgewiesen werden. Dagegen waren in den unmittelbar nach Entnahme des Blutes gewonnenen Zellfraktionen ungleich heterogenere Zusammensetzungen festzustellen, so daß man bei den als adhärent bzw. nicht adhärent bezeichneten Zellfraktionen von wechselnder Zellverunreinigung ausgehen muß.

Aufgrunddessen kann über die Ursache der erhöhten SCMC adhären-ter Zellfraktionen nur spekuliert werden. Definitive Aussagen könnten eventuell mit Mitteln wie z.B. hundemakrophagenspezifischen und lytischen monoklonalen Antikörpern erreicht werden. Aber auch diese Möglichkeit ist wegen der erforderlichen

Beständigkeit entsprechender Zelloberflächenmarker keine hundertprozentige Zukunftschance.

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten war es möglich, eine Verteilung spontan zytotoxischen Potentials auf verschiedene Effektorzellfraktionen im peripheren Hundeblut festzustellen. Als Erklärung für die in adhärenenten Fraktionen von Monozyten und neutrophilen Granulozyten auffällig angereicherte Fähigkeit zur Ausübung spontaner zellvermittelter Zytotoxizität kommen verschiedene Überlegungen in Frage:

- 1) Eine Ursache für die hohe Zytotoxizität leicht und stark oberflächenadhärenenter Zellpopulationen könnte die Kontamination dieser Fraktionen mit NK-Zellen sein (15,20). Es ist bekannt, daß sich aktivierte NK-Zellen vermehrt an Plastikoberflächen und Nylonwolle anheften (117). Bei gleichzeitigem Wegfall der nicht adhärenenten Natürlichen Suppressorzellen (NS-Zellen) (60), könnte die gemessene Zytotoxizität also durchaus von den adhäsiven LGL ausgegangen sein. Gegen diese Überlegung spricht allerdings das Ergebnis nach Depletion phagozytischer Zellen durch die Carbonylseismethode bzw. die Nylonfasersäule. Wären NK-Zellen tatsächlich die alleinigen Träger der SCMC beim Hund, so dürfte die Zahl lysierter Tumorzellen nach Abtrennung mononukleärer Phagozyten und neutrophiler Granulozyten nicht auf derartig geringe, teilweise nicht mehr erfaßbare Werte zurückgehen.
- 2) Eine weitere Erklärung für den Rückgang der SCMC nach Durchführung der Adhärenenzmethoden ist eine mögliche Beteiligung von Mono- bzw. Lymphokinen an der Aktivierung von NK-

Zellen. Nach Phagozytendepletion wären die Monokinquellen beseitigt, was eine Abnahme der spontanen Zytotoxizität bei NK-Zellen zur Folge hätte. Dies ist die einzige bisher für den Hund diskutierte, mögliche Erklärung des besprochenen Phänomens (84).

Es stellt sich jedoch die Frage, wie dann die hohe Zytotoxizität der angereicherten Fraktion von LGL zustande kommen kann, wo doch hier die erwähnten Monokine gänzlich fehlen. Möglicherweise übernehmen von den LGL nach Kontakt mit den Tumorzellen sezernierte Lymphokine (IFN, IL 2) die Aufgabe einer positiven Selbstregulation. Dies allein kann allerdings nicht die ganze Erklärung für den auffälligen Rückgang der SCMC nach Carbonyleisenbehandlung und Nylonfasersäule sein, da hier die von Phagozyten gereinigten lymphoiden Effektorzellen ebenfalls die Möglichkeit zur Lymphokinproduktion besitzen.

- 3) Für den Hund am ehesten zutreffend scheint die Vermutung, daß neben NK-Zellen auch Monozyten bzw. Makrophagen und eventuell auch neutrophile Granulozyten direkt zytotoxisch auf die Zielzelle wirken. Nachdem für beide Zellarten die Existenz zytotoxisch bzw. zytostatisch wirksamer, löslicher Faktoren (z.B. $\text{TNF-}\alpha$), Enzyme und Sauerstoffmetaboliten nachgewiesen ist, wäre eine unmittelbare Beteiligung dieser Zellen an der SCMC des Hundes durchaus vorstellbar. Gleichzeitig spricht die zur Erzielung optimaler CTAC-Tumorzelllysis durch Hundeeffektorzellen erforderliche Inkubationsdauer des ^{51}Cr -Tests von 16 - 18 Stunden für eine

Vermittlung der SCMC durch mononukleäre Phagozyten (31).

Geht man von den für Mensch und Maus gewonnenen Erkenntnissen (31) aus, so wären demnach die nach 4 Stunden Inkubation festgestellten spezifischen Lysiswerte beim Hund allein auf NK-Zellaktivität zurückzuführen.

Neben der Charakterisierung der an der SCMC des Hundes beteiligten Effektorzellarten, konnten auch Erkenntnisse über die Existenz nicht zellgebundener, aber von SCMC-Effektorzellen generierter zytotoxischer Mechanismen für die Spezies Hund gewonnen werden.

Durch Inkubation verschiedener Effektorzellfraktionen mit Zellen der Hundetumorzelllinie CTAC konnten lösliche zytotoxische Faktoren produziert werden. Beim Kontakt von Effektor- und Zielzellen wurden dabei die Verhältnisse des ^{51}Cr -Tests nachgeahmt, d.h. Effektor-Zielzellenverhältnisse und Inkubationsdauer wurden übernommen. Dies ermöglichte den Vergleich zwischen der durch zytotoxische Faktoren erzielten und der durch Effektorzellen der SCMC vermittelten Zielzelllysis.

Der Nachweis einer Zytotoxizität der jeweiligen Überstände wurde durch Lysis von Zielzellen im ^{51}Cr -Test erbracht. Im Unterschied zur effektorzellkontaktabhängigen Zytotoxizität konnte hier nach 4 Stunden Inkubationszeit noch keine signifikante Tumorzellschädigung durch die eingesetzten zellfreien Überstände nachgewiesen werden, sondern erst nach 18 Stunden. Diese Ergebnisse stehen mit den von BONAVIDA und WRIGHT (6) für Mensch und Maus beschriebenen im Einklang. Die Autoren führten dabei die verzögert eintretende Zytotoxizität zellfreier Über-

stände auf einen bei Freisetzung der Faktoren in das Medium erzielten Verdünnungseffekt zurück. Der Umfang der durch zytotoxische Faktoren erzielten Zielzelllysis wurde in den meisten Versuchen von den Effektorzellen um 20-30% übertroffen. Eine Ausnahme machten lediglich die aus stark plastikadhärenten Zellen freigesetzten CTAC-zytotoxischen Faktoren; sie lagen in der Zytotoxizität um 60% höher als die entsprechenden Producer-Effektorzellen.

Insgesamt konnte eine positive Korrelation zwischen dem zytotoxischen Potential getesteter Effektorzellfraktionen und dem der von ihnen freigesetzten zytotoxischen Faktoren nachgewiesen werden. Aus den besprochenen Ergebnissen wird ersichtlich, daß es sich bei der SCMC des Hundes keineswegs um eine von nur einer definierten Zellart vermittelte Eigenschaft handelt, sondern ein kompliziertes Zusammenspiel unterschiedlicher Effektorzellpopulationen und von diesen abstammender, löslicher zytotoxischer Faktoren vorliegt.

Alles deutet darauf hin, daß adhärente Zellen und hierbei vermutlich in erster Linie aktivierte Makrophagen, einen entscheidenden Anteil an der SCMC des Hundes haben. Ihre zytotoxische Wirkung haben sie sowohl durch direkte Interaktion mit der Zielzelle als auch als Folgereaktion durch Sekretion löslicher Faktoren, die zellunabhängig zytotoxisch wirken können. Des weiteren ist den aktivierten Makrophagen sicher eine gewichtige Rolle bei der Regulation der SCMC zuzuschreiben, da sie vor allem durch Produktion von IFN-gamma NK-Zellen, aber auch selbstregulierend Monozyten und Makrophagen aktivieren.

Neben den mononukleären Phagozyten hatten zweifelsohne auch die NK-Zellen im peripheren Blut der getesteten Tiere ihren Anteil an der SCMC. Allerdings konnten sie nicht so uneingeschränkt wie beim Menschen und der Maus als Hauptträger dieser Zytotoxizität identifiziert werden. Der zytotoxische Mechanismus der NK-Zellen scheint aber dem von Mensch und Maus sehr ähnlich zu sein, da auch für den Hund die Existenz und wirksame Beteiligung zytotoxischer Faktoren an der SCMC nachgewiesen werden konnte.

Darüberhinaus wurde mit Hilfe des lysosomentoxischen L-Leucin Methylesters bewiesen, daß intakte zytoplasmatische Granula für einen ungehinderten Ablauf der NK-Aktivität unentbehrlich sind. Das von BONAVIDA und WRIGHT (5) für den Menschen aufgestellte Stimulus-Sekretions-Modell zum Mechanismus der NK-Aktivität könnte also durchaus auch für den Hund in Frage kommen.

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Vermittlung spontaner Zytotoxizität des Hundes konnte wegen der ungenügenden Separationsmethoden im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Bisherige, meist mit humanen Effektorzellen durchgeführte Untersuchungen (16,27,31,41,46,105) sprechen jedoch eher gegen eine maßgebliche Beteiligung dieser Zellart an der SCMC. Die spontane zellvermittelte Zytotoxizität ist eine Funktion des Immunsystems, deren Erforschung in der Veterinärmedizin am Anfang steht, aber einen bedeutenden Faktor bei der vergleichenden, entwicklungsgeschichtlichen Untersuchung des gesamten paraspezifischen Teiles des Immunsystems verkörpert. Nachdem die NK-Zellen die Erwartungen, die die Humanmedizin im

Zusammenhang mit der Tumorthherapie hatte bisher nur teilweise erfüllen konnten, wird heute alles daran gesetzt, die Mechanismen der "NK-Aktivität" und SCMC völlig aufzuklären. Beim Hund dürfte die Rolle der SCMC sowohl in der Tumorbekämpfung wie zur Eliminierung infizierter (Viren, Bakterien, Parasiten) Körperzellen etwa gleichrangige Bedeutung für die Veterinärmedizin haben. Kenntnisse über Stimulierbarkeit, Organverteilung, Kinetik, Zielzellspektrum sowie Vorkommen und Aktivität der Effektorzellen der SCMC in verschiedenen Altersgruppen (wie bei der Maus schon bekannt) sind für eine erfolgreiche medikamentelle (Immunmodulatoren) Stimulation von großer Bedeutung. Auch bei der Spezies Hund spielen dabei bekannte Immuntransmitter (Mediatoren, Zytokine) ebenso wie die neu entdeckten "zytotoxischen Faktoren" sicher eine entscheidende Rolle.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Leukozyten aus dem peripheren Blut von Hunden wurden mit physikalisch-biologischen Separationsmethoden in verschiedene Zellfraktionen aufgetrennt. Die Fähigkeit zur Ausübung spontaner zellvermittelter Zytotoxizität (SCMC) wurde an drei allogenen und drei xenogenen Tumorzelllinien geprüft. Das canine Thyreoidea-Adenokarzinom CTAC erwies sich als ideale Zielzelle in einem Chromium 51- Freisetzungstest.

Mit verschiedenen Effektorzellpopulationen wurden die Kinetik der Zerstörbarkeit dieser Tumorzellen ebenso wie der Einfluß einer 24-stündigen in vitro-Inkubation auf die Effektorzellaktivität untersucht.

Unter den aufgetrennten Effektorzellen konnten Natürliche Killerzellen (NK) aufgrund ihrer Morphologie (große granulierte Lymphozyten) und einer stark erhöhten spontanen Zytotoxizität nach selektiver Anreicherung eindeutig nachgewiesen werden. Andererseits war bei der Zellfraktion mit der Eigenschaft starker Plastikadhärenz (Makrophagen) ebenfalls eine hohe zytotoxische Aktivität feststellbar. Dies weist darauf hin, daß aktivierte Makrophagen entscheidend an der SCMC des Hundes mitbeteiligt sind.

Der Nachweis der zytotoxischen Aktivität nicht zellgebundener, löslicher Faktoren gelang über die Gewinnung zellfreier Überstände aus Tumor(CTAC)-Effektorzellgemischen sowohl bei Einsatz von NK-Zellen als auch von Effektorzellen mit Makrophageneigenschaften (Plastikadhärenz). Die gezielte Aufhebung der

SCMC mit dem gegen den NK-Zellmarker ganglio-N-tetraosylceramide gerichteten Antikörper anti-asialo GM 1 gelang nur teilweise und inkonstant, wogegen das lysosomotrope Agens L-Leucin Methylester eine dosisabhängige Reduktion der SCMC bewirkte.

Im Literaturteil wird ein Überblick über Effektorzellen, Mechanismen, funktionelle Bedeutung und Regulation der SCMC und deren Nachweismöglichkeiten gegeben.

SUMMARY

Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in peripheral blood of dogs

Canine peripheral blood leukocytes were separated into different cell fractions by various physical and biological methods. The inherent ability of each cell fraction to exert spontaneous cell-mediated cytotoxicity (SCMC) was tested on three allogeneic and three xenogeneic tumor cell lines.

The canine thyroid adenocarcinoma CTAC proved to be an ideal target cell in a chromium-51 release assay.

The kinetics of susceptibility to lysis mediated by different effector cell populations were determined, as well as the influence of in vitro incubation for 24 hours on effector cell activity.

Among the separated effector cells natural killer (NK) cells could be clearly identified due to their morphology (large granular lymphocytes) and to their highly increased spontaneous cytotoxicity following selective enrichment.

However, high cytotoxic activity could also be determined in the cell fraction with strong plastic adherence (macrophages). This shows that activated macrophages play an important role in the SCMC of the dog.

The cytotoxic activity of unbound, soluble factors could be demonstrated by obtaining cellfree products from tumor(CTAC)-effector cell mixtures using both NK cells and effector cells with macrophage properties (plastic adherence).

The removal of the SCMC with the antibody anti-asialo GM 1, which was directed against the NK cell marker ganglio-N-tetraosylceramide, was only partially successful and not constant, whereas the lysosomotrope agent L-Leucin Methylester produced a dose-dependent reduction of the SCMC.

The literature section gives a survey of effector cells, mechanisms, functional importance and regulation of SCMC. In addition, methods for determination of SCMC are enumerated.

6. ANHANG

Tabelle 2: Rasse, Geschlecht und Alter der verwendeten
Probanden

HUND BEZEICHNUNG	RASSE	GESCHLECHT	ALTER*
7 N	Beagle	m	1
N 531	"	w	8
N 779	"	m	6
N 796	"	w	6
N 805	"	m	5
N 818	"	m	5
N 865	"	m	4
N 881	"	m	4
N 895	Labrador	w	3
N 899	Beagle	w	3
N 909	"	w	3
N 913	Labrador-Mix	w	3
N 933	Beagle	w	3
N 934	"	m	3
N 969	"	w	2
N 990	"	w	1
N 993	"	m	1
N 994	"	m	1

* Altersangabe in Jahren; m = männlich; w = weiblich

N = Tiere aus der GSF

Fortsetzung Tabelle 2:

HUND BEZEICHNUNG	RASSE	GESCHLECHT	ALTER*
I 1	Dt. Schäferhund	m	10
I 2	"	w	10
I 3	"	m	5
Ch 1	Dt. Kurzhaar	m	7
Ch 2	Collie-Mix	m	10
Ch 3	Riesenschnauzer	m	5
Ch 4	Dt. Schäferhund	m	7
Ch 5	Dogge	w	8
Ch 6	Boxer	m	1
Ch 7	Riesenschnauzer	m	10
Ch 8	Dt. Schäferhund	m	2
Ch 9	Belg. "	m	2
Ch 10	Berner Sennenhund	m	1
Ch 11	Dt. Schäferhund	w	3
Ch 12	"	w	1
Ch 13	"	w	6
Ch 14	"	w	6
Ch 15	Kerry-Blue Terrier	w	4
Ch 16	Dt. Schäferhund	m	½

* Altersangabe in Jahren; m = männlich; w = weiblich

I = Tiere aus der Klinik für Innere Krankheiten

Ch = Tiere aus der Chirurgischen Tierklinik

Tabelle 5: SCMC gegen CTAC der über das Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Effektorzellen von 30 Hunden

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 881	26.6.86	19,6	15,5	8,7	n.d.
I 1	7.7.86	37,5	19,8	12,3	11,7
Ch 1	15.7.86	27,4	20,3	19,6	19,3
Ch 2	17.7.86	16,5	8,7	5,1	4,1
Ch 3	"	23,6	11,9	11,7	10,7
I 2	31.7.86	12,1	6,8	4,8	3,0
I 3	"	37,2	23,5	15,7	10,8
N 934	"	33,9	24,8	17,4	12,1
Ch 4	7.8.86	18,2	11,2	10,5	3,5
Ch 5	"	16,3	10,4	5,8	2,5
N 779	29.9.86	43,4	37,1	27,7	20,6
N 531	"	43,2	30,0	13,7	9,4
N 933	2.10.86	75,0	51,3	37,2	31,6
N 899	"	79,5	44,3	27,8	21,5
N 818	15.10.86	9,8	1,9	-	-
N 805	"	17,3	10,2	10,0	4,0
N 796	"	19,8	14,3	8,3	5,9
Ch 8	20.10.86	27,2	13,2	9,6	1,1
Ch 9	"	31,9	15,1	10,7	2,2
Ch 10	"	42,6	33,6	17,4	9,2
N 895	3.11.86	34,3	28,9	18,4	11,6

Fortsetzung Tabelle 5:

HUND BEZEICHNUNG	TEST-* DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
7 N	3.11.86	39,4	27,8	17,5	10,6
Ch 11	12.11.86	68,8	54,6	40,6	32,9
Ch 12	17.11.86	20,9	12,9	11,1	4,5
Ch 13	"	13,0	7,9	7,0	2,7
Ch 14	"	5,9	3,5	1,8	-
Ch 15	23.11.86	53,2	48,9	37,3	31,9
Ch 16	"	63,1	52,4	37,8	29,0
N 909	$\bar{x}$ aus drei Experimenten	14,1	10,9	5,8	6,0
N 969	$\bar{x}$ aus zwei Experimenten	82,7	58,1	48,6	32,2
$\bar{x} \pm s.$		34,2 $\pm$ 3,9	23,6 $\pm$ 3,0	16,7 $\pm$ 2,3	11,9 $\pm$ 2,2
n		30	30	30	29

$\bar{x}$ = Mittelwert; * Testdauer: 18 h

s. = Standardfehler; n.d. = nicht durchgeführt

n = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 6: SCMC gegen CTAC der im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Effektorzellen der Tiere N 909 und N 969

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.6.86	9,8	6,5	-	n.d.
	10.7.86	19,8	14,1	9,2	n.d.
	31.7.86	12,6	12,1	8,1	6,0
	$\bar{x} \pm s$	14,1 $\pm$ 5,2	10,9 $\pm$ 3,9	5,8 $\pm$ 5,0	6,0 $\pm$ 0
	n	3	3	3	1
N 969	10.7.86	85,9	67,5	57,0	40,2
	2.10.86	79,5	48,7	40,1	24,1
	$\bar{x} \pm s$	82,7 $\pm$ 4,5	58,1 $\pm$ 13,3	48,6 $\pm$ 12,0	32,2 $\pm$ 11,4
	n	2	2	2	2

* Testdauer: 18 h; n.d. = nicht durchgeführt

$\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung

n = Anzahl durchgeführter Messungen

Tabelle 8: SCMC gegen CTAC der nicht plastikadhärenten Zellen

HUND BEZEICHNUNG	TEST- ^a DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		----- EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS -----			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 865	21.5.86	17,9	13,1	8,0	6,5
N 881	26.6.86	13,9	7,5	6,2	n.d.
I 1	7.7.86	16,5	6,2	4,4	3,0
N 969	10.7.86	43,7	29,6	16,8	16,4
Ch 1	15.7.86	17,8	13,5	10,4	6,5
I 2	31.7.86	11,4	6,7	4,9	3,1
N 934	"	n.d.	11,6	10,5	7,2
Ch 4	7.8.86	6,6	1,5	0,8	0,8
Ch 5	"	10,8	8,1	4,9	2,2
Ch 6	"	9,0	6,8	4,2	3,8
N 779	29.9.86	18,6	14,3	9,4	5,4
N 805	15.10.86	16,6	8,4	8,2	1.2
N 796	"	19,4	11,2	7,5	5,8
Ch 9	20.10.86	22,9	13,5	11,9	1,9
Ch 10	"	19,6	12,9	5,6	4,2
N 895	3.11.86	34,5	27,3	22,2	12,3
7 N	"	33,5	21,7	18,1	11,9
Ch 11	12.11.86	44,6	32,8	22,6	14,7
Ch 12	17.11.86	18,3	13,7	9,0	6,1
Ch 16	23.11.86	29,6	24,7	21,9	20,3
N 909	$\bar{x}$ aus vier Experimenten	9,9	7,2	5,9	5,4
N 913	$\bar{x}$ aus drei E.	16,8	9,8	6,1	4,8

Fortsetzung Tabelle 8:

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	20,6 $\pm$ 2,3 (21)	13,7 $\pm$ 1,8 (22)	10,0 $\pm$ 1,4 (22)	6,8 $\pm$ 1,2 (21)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; n.d. = nicht durchgeführt
(n) = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

* Testdauer: 18 h

Tabelle 8 a: SCMC gegen CTAC der nicht plastikadhärenten Effektorzellen der Tiere N 909 und N 913

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.5.86	13,3	8,9	7,1	4,2
	26.6.86	2,4	0,6	-	n.d.
	10.7.86	12,9	11,2	8,7	6,0
	31.7.86	10,9	8,2	7,6	5,9
	$\bar{x} \pm s$ (n)	9,9 $\pm$ 5,1 (4)	7,2 $\pm$ 4,6 (4)	5,9 $\pm$ 4,0 (4)	5,4 $\pm$ 1,0 (3)
N 913	5.5.86	24,8	11,6	8,1	6,4
	21.5.86	17,7	11,7	7,9	3,1
	26.6.86	7,8	6,0	2,4	n.d.
	$\bar{x} \pm s$ (n)	16,8 $\pm$ 8,5 (3)	9,8 $\pm$ 3,3 (3)	6,1 $\pm$ 3,2 (3)	4,8 $\pm$ 2,3 (2)

* Testdauer: 18 h; $\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung
(n) = Anzahl durchgeführter Messungen; n.d. = nicht durchgeführt

Tabelle 9: SCMC gegen CTAC der leicht plastikadhärenten Zellen

HUND BEZEICHNUNG	TEST-* DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
I 1	7.7.86	23,7	11,7	8,7	5,9
Ch 6	7.8.86	6,3	5,5	2,1	0,9
N 779	29.9.86	43,4	35,4	28,5	17,6
N 909	$\bar{x}$ aus drei Experimenten	23,3	15,4	12,8	9,3
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		24,2 $\pm$ 7,6 (4)	17,0 $\pm$ 6,5 (4)	13,0 $\pm$ 5,6 (4)	8,4 $\pm$ 3,5 (4)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; * Testdauer: 18 h
(n) = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 9 a: SCMC gegen CTAC der leicht plastikadhärenten Effektorzellen des Tieres N 909

HUND BEZEICHNUNG	TEST-* DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.5.86	22,3	10,3	8,4	9,0
	10.7.86	29,9	20,8	19,9	n.d.
	31.7.86	17,8	15,0	10,0	9,6
$\bar{x} \pm s$ (n)		23,3 $\pm$ 6,1 (3)	15,4 $\pm$ 5,3 (3)	12,8 $\pm$ 6,2 (3)	9,3 $\pm$ 0,4 (2)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung; * Testdauer: 18 h
(n) = Anzahl durchgeführter Messungen

Tabelle 10: SCMC gegen CTAC der stark plastikadhärenten Effektorzellen

HUND BEZEICHNUNG	TEST- [*] DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
I 1	7.7.86	23,2	15,0	11,0	5,8
N 779	29.9.86	25,9	20,4	17,6	9,4
Ch 9	20.10.86	19,3	7,6	6,2	-
N 895	3.11.86	43,2	34,5	29,6	18,4
Ch 11	12.11.86	73,5	62,9	29,6	18,4
Ch 12	17.11.86	20,1	15,0	15,3	12,1
N 909	$\bar{x}$ aus zwei Experimenten	29,5	14,0	9,0	5,9
N 913	$\bar{x}$ aus zwei Experimenten	28,3	16,1	10,2	6,1
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		32,9 $\pm$ 6,4 (8)	23,2 $\pm$ 6,3 (8)	18,9 $\pm$ 5,4 (8)	12,2 $\pm$ 4,4 (8)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; * Testdauer: 18 h

(n) = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 10 a: SCMC gegen CTAC der stark plastikadhärenten
Effektorzellen der Hunde N 909 und N 913

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.5.86	29,5	19,2	15,9	5,9
	26.6.86	n.d.	8,7	2,1	n.d.
	$\bar{x} \pm s$ (n)	29,5 (1)	14,0 $\pm$ 7,4 (2)	9,0 $\pm$ 9,8 (2)	5,9 (1)
N 913	5.5.86	28,3	24,3	14,6	7,1
	26.6.86	n.d.	7,8	5,8	5,0
	$\bar{x} \pm s$ (n)	28,3 (1)	16,1 $\pm$ 11,7 (2)	10,2 $\pm$ 6,2 (2)	6,1 $\pm$ 1,5 (2)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung; * Testdauer: 18 h

(n) = Anzahl durchgeführter Messungen

Tabelle 11: SMC gegen CTAC der Effektorzellen nach Behandlung mit Carboneisenpulver

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.6.86	5,0	0,2	-	n.d.
N 881	"	10,8	5,5	-	n.d.
N 913	"	9,6	4,1	1,5	n.d.
I 1	7.7.86	8,6	0,9	-	-
I 2	31.7.86	3,8	1,2	-	0,2
N 994	"	12,2	8,0	4,5	2,5
N 934	"	6,3	5,7	3,2	0,9
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		8,0 $\pm$ 1,2 (7)	3,7 $\pm$ 1,1 (7)	1,3 $\pm$ 0,7 (7)	0,9 $\pm$ 0,6 (4)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; n.d. = nicht durchgeführt
n = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde
* Testdauer: 18 h

Tabelle 11 a: SMC gegen CTAC der nicht nylonadhärenten, carbonyleisenbehandelten Effektorzellen

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.6.86	-	-	-	n.d.
N 881	"	-	-	-	n.d.
N 913	"	-	-	-	n.d.
I 2	31.7.86	n.d.	0,6	-	-

n.d. = nicht durchgeführt; * Testdauer: 18 h

Tabelle 12: SCMC gegen CTAC der nicht nylonadhärenten Effektorzellen

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 881	26.6.86	-	-	-	n.d.
N 913	"	1,2	0,9	-	n.d.
I 1	7.7.86	12,9	5,3	4,2	1,0
N 779	29.9.86	-	-	-	-
N 796	15.10.86	2,3	1,1	-	-
Ch 9	20.10.86	4,3	3,5	-	n.d.
N 895	3.11.86	16,7	6,9	5,0	0,3
Ch 11	12.11.86	28,5	17,3	15,4	7,0
Ch 12	17.11.86	11,4	6,3	5,7	4,0
Ch 16	23.11.86	26,6	17,5	12,6	8,2
N 909	$\bar{x}$ aus vier Experimenten	3,0	1,5	0,9	1,1
$\bar{x} \pm s_e$		9,7 $\pm$ 3,1	5,5 $\pm$ 1,9	4,0 $\pm$ 1,7	2,7 $\pm$ 1,2
n		11	11	11	8

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; * Testdauer: 18 h

n.d. = nicht durchgeführt

n = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 12 a: SCMC gegen CTAC der nicht nylonadhärenten
Effektorzellen des Hundes N 909

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		----- EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS -----			
		30:1	15:1	7,5:1	3,75:1
N 909	26.5.86	8,2	4,9	3,6	3,2
	26.6.86	-	-	-	-
	10.7.86	-	-	-	-
	31.7.86	3,8	1,0	-	-
	$\bar{x} \pm s$	3,0 $\pm$ 3,9	1,5 $\pm$ 2,3	0,9 $\pm$ 1,8	1,1 $\pm$ 1,8
	n	4	4	4	3

$\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung; * Testdauer: 18 h

n = Anzahl durchgeführter Messungen

Tabelle 13: Gegenüberstellung der SCMC gegen CTAC der nylonadhären-
hären- und nicht nylonadhären- Effektorzellen

HUND BEZEICHNUNG	EFFEKTOR- ZELL- FRAKTION	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		----- EFFEKTOR-ZIELZELLENVERHÄLTNIS -----			
		30:1	15:1	7,5:1	3.75:1
Ch 9	nicht nylon- adh. Zellen	4,3	3,5	-	n.d.
20.10.86	nylonadh. Zellen	19,3	7,6	6,2	-
N 895	nicht nylon- adh. Zellen	16,7	6,9	5,0	0,3
3.11.86	nylonadh. Zellen	21,5	20,6	8,7	7,0
Ch 12	nicht nylon- adh. Zellen	11,4	6,3	5,7	4,0
17.11.86	nylonadh. Zellen	19,1	12,6	7,3	3,7
Ch 16	nicht nylon- adh. Zellen	n.d.	17,5	12,6	8,2
23.11.86	nylonadh. Zellen	n.d.	19,6	14,2	13,6
nicht nylonadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$	10,8 $\pm$ 3,6	8,6 $\pm$ 3,1	5,8 $\pm$ 2,6	4,2 $\pm$ 2,3
	n	3	4	4	3
nylon- adh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$	20,0 $\pm$ 0,8	15,1 $\pm$ 3,1	9,1 $\pm$ 1,8	8,1 $\pm$ 2,9
	n	3	4	4	4

$\bar{x}$ = Mittelwert; * Testdauer: 18 h

s_e = Standardfehler; n.d. = nicht durchgeführt

n = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 14: Anreicherung zytotoxischer Effektorzellen in den Percollfraktionen niederer Dichte (Fraktionen 1-3)

EFFEKTOR ZELL- FRAKTION	% SPEZIF.LYSIS BEI E:T-VERHÄLTNIS 30:1				$\bar{x} \pm s$
	N 913 ^a		N 909 ^a		
	----- 5.5.86 ^b	----- 26.5.86 ^b	----- 10.7.86 ^b	----- 31.7.86 ^b	N 909 ^a
nicht plastik- adh. Zellen	24,8	13,3	12,9	10,4	12,4±1,3
nicht nylon- adh. Zellen	n.d.	8,2	-	3,8	4,0±4,1
Percollfrak- tionen 1-3	32,3	42,9	15,4	15,5	24,6±15,9
Percollfrak- tionen 4-6	13,6	15,2	3,0	5,8	8,0±6,4
Percollfrak- tion 7	n.d.	20,3	11,6	11,2	14,4±5,1

^a Hund - Bezeichnung

^b Testdatum bei einer Testdauer von 18 h

$\bar{x}$ = Mittelwert; s = Standardabweichung

n.d. = nicht durchgeführt; E:T = Effektor-Zielzellen

Tabelle 15: Spezifische Lysis von Tumorzellen(CTAC), erzielt durch zellfreie Überstände von Effektor-Tumorzell(CTAC)-Inkubationsgemischen im 4 h- und 18 h-⁵¹Cr-Test

EFFEKTORZELL-FRAKTION, MIT DER DIE ÜBERSTÄNDE HERGESTELLT WURDEN	TEST-DAUER	% SPEZIFISCHE LYSIS ($\bar{x} \pm s_e$)			
		VOLUMENPROZENT ZUGABE AN ÜBERSTÄNDEN			
		100	50	25	12,5
im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierte Zellen (2)	4 h	1,1±0	2,3±0,6	0,4±0,4	0,7±0,3
	18 h	39,9±8,8	29,5±4,5	24,1±8,3	15,8±7,8
nicht plastik-adhärenente Zellen (2)	4 h	0,5±0,3	0,8±0,2	0,8±0,5	0,3±0,3
	18 h	32,4±7,4	23,3±9,8	17,8±5,9	10,8±4,6
stark plastik-adhärenente Zellen (1)	4 h	1,7	1,7	1,2	0,9
	18 h	35,7	28,8	24,2	12,6
nicht nylon-adhärenente Zellen (1)	4 h	-	-	-	-
	18 h	3,2	1,4	-	-

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler

(n) = Anzahl verwendeter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 16: Lysis von CTAC im ^{51}Cr -Test durch zytotoxische Faktoren (Überstände produziert mit im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierten Effektorzellen)

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		VOLUMENPROZENT ZUGABE AN ÜBERSTÄNDEN			
		100	50	25	12,5
Ch 9	22.10.86	31,1	24,1	15,8	7,9
Ch 10	"	48,6	34,0	32,3	23,6
7 N	4.11.86	10,5	8,1	7,4	9,2
N 895	"	10,7	8,9	2,2	4,9
Ch 11	18.11.86	19,7	13,8	15,9	12,7
Ch 12	"	14,0	11,3	11,1	8,9
Ch 14	"	11,6	7,8	7,3	11,4
$\bar{x} \pm s$		20,9 $\pm$ 5,4	15,4 $\pm$ 3,8	14,1 $\pm$ 3,3	11,2 $\pm$ 2,3
n		7	7	7	7

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; * Testdauer: 18 h

n = Anzahl verwendeter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 16 a: Lysis von CTAC im ^{51}Cr -Test durch zytotoxische Faktoren (Überstände produziert mit nicht plastikadhärenten Zellen)

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		VOLUMENPROZENT ZUGABE AN ÜBERSTÄNDEN			
		100	50	25	12,5
7 N	4.11.86	12,9	10,3	15,4	7,2
N 895	"	8,7	7,6	3,7	5,4
Ch 12	18.11.86	7,0	9,6	11,0	7,7
Ch 9	22.10.86	25,0	13,5	11,8	6,2
Ch 10	"	39,8	33,1	23,7	15,4
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		18,7 $\pm$ 6,1 (5)	14,8 $\pm$ 4,7 (5)	13,2 $\pm$ 3,3 (5)	8,4 $\pm$ 1,8 (5)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e =Standardfehler; * Testdauer: 18 h
(n)=Anzahl verwendeter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 16 b: Lysis von CTAC im ^{51}Cr -Test durch zytotoxische Faktoren (Überstände produziert mit nicht nylon-adhären Zellen)

HUND BEZEICHNUNG	TEST- * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		VOLUMENPROZENT ZUGABE AN ÜBERSTÄNDEN			
		100	50	25	12,5
Ch 10	22.10.86	3,2	1,4	-	-
N 895	4.11.86	-	1,9	4,3	2,1
Ch 12	18.11.86	18,0	12,5	12,1	4,2
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		7,1 $\pm$ 5,5 (3)	5,3 $\pm$ 3,6 (3)	5,5 $\pm$ 3,5 (3)	2,1 $\pm$ 1,2 (3)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e =Standardfehler; * Testdauer: 18 h
(n)= Anzahl verwendeter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 16 c: Lysis von CTAC im ^{51}Cr -Test durch zytotoxische Faktoren (Überstände produziert mit stark plastikadhärenten Zellen)

HUND BEZEICHNUNG	TEST- [*] DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS			
		VOLUMENPROZENT ZUGABE AN ÜBERSTÄNDEN			
		100	50	25	12,5
Ch 10	22.10.86	35,7	28,8	24,2	12,6
Ch 12	18.11.86	28,7	24,6	18,6	13,1
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		32,2 $\pm$ 3,5 (2)	26,7 $\pm$ 2,1 (2)	21,4 $\pm$ 2,8 (2)	12,9 $\pm$ 0,3 (2)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; *, (n) = wie Tabellen 16 a, b

Tabelle 17: Im Ficoll-Dichtegradientenverfahren isolierte Effektorzellen - Vergleich der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen mit zellfreien Überständen aus denselben Effektor-Tumorzellgemischen (CTAC)

HUND BEZEICHNUNG	TEST [*] DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS VON CTAC	
		EFFEKTORZELLEN (E:T-VERH. 30:1)	ZELLFREIE ÜBERSTÄNDE (100 VOLUMENPROZENT)
Ch 9	21./22.10.86	31,9	31,1
Ch 10	"	42,6	48,6
7 N	3./4.11.86	39,4	10,5
N 895	"	34,3	10,7
Ch 12	17./18.11.86	20,9	14,0
Ch 13	"	13,0	19,7
Ch 15	"	5,9	11,6
$\bar{x} \pm s_e$ (n)		26,9 $\pm$ 5,3 (7)	20,9 $\pm$ 5,4 (7)

E:T-VERH. = Effektor-Zielzellenverhältnis; $\bar{x}$ = Mittelwert
 s_e = Standardfehler; *, (n) = wie Tabellen 17 a, b, c

Tabellen 17 a,b und c: Nicht plastik- bzw. nylonadhärente Effektorzellen sowie stark plastikadhärente Zellen - Vergleich der zytotoxischen Aktivität der Effektorzellen mit zellfreien Überständen aus denselben Effektor-Tumorzellgemischen (CTAC)

HUND BEZEICHNUNG	TEST * DATUM	% SPEZIFISCHE LYSIS VON CTAC	
		EFFEKTORZELLEN (E:T-VERH. 30:1)	ZELLFREIE ÜBERSTÄNDE (100 VOLUMENPROZENT)
Ch 9	21./22.10.86	22,9	25,0
Ch 10	"	19,6	39,8
7 N	3./4.11.86	33,5	12,9
N 895	"	34,5	8,7
Ch 12	17./18.11.86	18,3	7,0
nicht plastikadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	25,8 $\pm$ 3,4 (5)	18,7 $\pm$ 6,1 (5)
Ch 9	21./22.10.86	4,3	3,2
N 895	3./4.11.86	16,7	-
Ch 12	17./18.11.86	11,4	18,0
nicht nylonadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	10,8 $\pm$ 3,6 (3)	7,1 $\pm$ 5,5 (3)
Ch 9	21./22.10.86	19,3	35,7
Ch 12	"	20,1	28,7
stark plastikadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	19,7 $\pm$ 0,4 (2)	32,2 $\pm$ 3,5 (2)

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler; * Testdauer: 18 h
E:T-VERH. = Effektor-Zielzellenverhältnis
(n) = Anzahl getesteter Blutproben verschiedener Hunde

Tabelle 18: Reduktion der SCMC gegen CTAC von verschiedenen Effektorzellfraktionen durch Behandlung mit anti-asialo GM 1 Antikörper

HUND BEZEICHNUNG ----- EFFEKTORZELL- FRAKTION	TEST-* DATUM	% SPEZIF. LYSIS (E:T-VERH. 30:1) ----- BEHANDLUNG DER EFFEKTORZELLEN MIT: KOMPLEMENT ANTI-ASIALO GM1 + KOMPLEMENT	
Ch 7	17.7.86	23,6	8,4
Ch 13	17.11.86	13,0	3,3
Zellen nach Ficoll-Dichte- gradientenverf.	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	18,3 $\pm$ 5,3 (2)	5,9 $\pm$ 2,5 (2)
Ch 11	12.11.86	44,6	32,6
Ch 12	17.11.86	18,3	9,5
nicht plastikadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	31,5 $\pm$ 13,2 (2)	21,1 $\pm$ 11,5 (2)
N 909			
Percoll- fraktionen 1-3	10.7.86	15,4	5,6
Ch 12			
stark plastikadh. Zellen	17.11.86	20,1	11,5

E:T-VERH. = Effektor-Zielzellenverhältnis; * Testdauer: 18 h

$\bar{x}$ = Mittelwert; s_e = Standardfehler

(n) = Anzahl durchgeführter Versuche

Tabelle 19: Reduktion der SCMC gegen CTAC von verschiedenen Effektorzellfraktionen durch 30-minütige Inkubation der Effektorzellen mit L-Leucin Methylester (LeuOMe)

HUND BEZEICHNUNG ----- EFFEKTORZELL- FRAKTION	TEST-* DATUM	% SPEZIF. LYSIS (E:T-VERH. 30:1) ----- BEHANDLUNG DER EFFEKTORZELLEN :		
		UNBEHANDELT	20mM (LeuOMe)	40mM
N 913	5.5.86	24,8	n.d.	4,1
N 865	21.5.86	17,9	12,1	9,8
N 913	"	17,7	8,2	9,1
Ch 6	7.8.86	9,0	5,2	3,4
nicht plastikadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	17,4 $\pm$ 3,2 (4)	8,5 $\pm$ 2,0 (3)	6,6 $\pm$ 1,7 (4)
N 909	26.5.86	8,2	5,2	-
Ch 11	7.7.86	12,9	n.d.	3,5
nicht nylonadh. Zellen	$\bar{x} \pm s_e$ (n)	10,6 $\pm$ 2,3 (2)	5,2 (1)	1,8 $\pm$ 1,7 (2)
N 913				
Percollfrak- tionen 1-3	5.5.86	32,3	n.d.	2,3

E:T-VERH. = Effektor-Zielzellenverhältnis; * Testdauer: 18 h

n.d. = nicht durchgeführt; $\bar{x}$ = Mittelwert

s_e = Standardfehler; (n) = Anzahl durchgeführter Versuche

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allavena, P.
Ortaldo, J.R.
(1986)
Separation and characterization of phenotypically distinct subsets of NK cells
in "Immunobiology of Natural Killer Cells", Volume I
ed. E.Lotzova, R.B.Herberman, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 21
2. Bielefeldt Ohmann, H.
Davis, W.C.
Babiuk, L.A.
(1985)
Functional and phenotypic characteristics of bovine natural cytotoxic cells
Immunobiol. 169, 503
3. Blomberg, K.
Granberg, C.
Hemmilä, J.
Lövgren, T.
(1986)
Europium-labelled target cells in an assay of natural killer activity
J.Immunol.Meth. 92, 117 and 225
4. Bøyum, A.
(1968)
Separation of leukocytes from blood and bone marrow
Scan.J.Clin.Invest. 21, Suppl. 97, 77
5. Bonavida, B.
Wright, S.C.
(1986)
Role of natural killer cytotoxic factors in the mechanism of target-cell killing by NK cells
J.Clin.Immunol. 6, 1
6. Bonavida, B.
Wright, S.C.
(1986)
Natural killer cytotoxic factors (NKCF) role in cell-mediated cytotoxicity in: "Immunobiology of Natural Killer Cells", Volume I
ed. E.Lotzova, R.B.Herberman, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 125
7. Bowles, C.A.
White, G.S.
Lucas, D.
(1975)
Rosette formation by canine peripheral blood lymphocytes
J.Immunol. 114, 399
8. Brunner, K.T.
Mauel, J.
Schindler, R.
(1966)
In vitro studies of cell-bound immunity; cloning assay of the cytotoxic action of sensitized lymphoid cells on allogenic target cells
Immunol. 11, 499

9. Brunner, K.T.
Mauel, J.
Cerottini, J.-C.
Chapuis, B.
(1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogenic target cells in vitro
J.Immunol. 14, 181
10. Büttner, M.
(1984) Spontane zellvermittelte Zytotoxizität
Tierärztl.Umschau 39, 214
11. Büttner, M.
Strube, W.
Wolf, G.
Hoerstke, M.
(1987) Parapoxvirus als Induktor unspezifischer Abwehrmechanismen
Tierärztl.Umschau 42, 14
12. Buschmann, H.G.
(1984) Die Trennung und Differenzierung von immunkompetenten Zellen bei Schwein und Rind
Zbl.Vet.Med. 31, 403
13. Buurman, W.A.
Vegt, P.A.
Groenewegen, G.
v.d.Linden, C.J.
Jeunhomme, G.M.A.A.
(1982) Analysis of buoyant density of canine peripheral blood lymphocytes with PVP-Silica (Percoll) density gradients
Vet.Immunol.Immunopath. 3, 547
14. Cepica, A.
Derbyshire, J.B.
(1986) The tissue distribution of spontaneous cell-mediated cytotoxicity effector lymphocytes in swine
J.Comp.Path. 96, 353
15. Chang, Z.L.
Hoffman, T.
Bonvini, E.
Stevenson, H.C.
Herberman, R.B.
(1983) Spontaneous cytotoxicity by monocyte-enriched subpopulations of human peripheral blood mononuclear cells against human or mouse anchorage-dependent tumor cell lines
Scand.J.Immunol. 18, 439
16. Chee, D.O.
Townsend, C.M.
Galbraith, M.A.
Eilber, F.R.
Morton, D.L.
(1978) Selective reduction of human tumor cell populations by human granulocytes in vitro
Canc.Res. 38, 4534
17. Djeu, J.Y.
(1982) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and natural killer-cell phenomenon
J.Am.Vet.Med.Ass. 181, 1043

18. Esser, R.E. Rosette formation by canine leuko-
Cosgrove, M. cytes with human erythrocytes
Scott, G. Transplantation 24, 223
Cosini, A.B.
(1977)
19. Fischer, D.G. Tumor cell killing by freshly isolated
Hubburt, W.J. peripheral blood monocytes
Koren, H.S. Cell.Immunol. 58, 426
(1981)
20. Freundlich, B. The cytotoxic effector cells in pre-
Trinchieri, G. parations of adherent mononuclear
Perussia, B. cells from human peripheral blood
Zurier, R.B. J.Immunol. 132, 1255
(1984)
21. Gorelik, E Role of natural killer cells in the
Herberman, R.B. control of tumor growth and metastatic
(1986) spread
in: "Cancer Immunology: Innovative
Approaches to Therapy"
ed. R.B.Herberman, Martinus Nijhoff
Publishers, Boston, 151
22. Graves, S.S. Studies on the lethal hit stage of NK
Bramhall, J. cell-mediated cytotoxicity
Bonavida, B. J.Immunol. 137, 1977
(1986)
23. Grossman, Z. Natural killer cells and their rela-
Herberman, R.B. tionship to T-cells: Hypothesis on the
(1986) role of T-cell receptor gene re-
arrangement in the course of adaptive
differentiation
Canc.Res. 46, 2651
24. Haller, O. Generation of natural killer cells:
Kiessling, R. an autonomous function of the bone
Orn, A. marrow
Wigzell, H. J.Exp.Med. 145, 1411
(1977)
25. Hamburger, A.W. Primary bioassay of human stem cells
Salmon, S.E. Science 197, 461
(1977)
26. Herberman, R.B. Introduction
(1980) in: "Natural cell-mediated immunity
against tumors"
ed. R.B.Herberman, Academic Press,
New York, 1

27. Herberman, R.B.
(1980) Summary: Natural Granulocyte Cytotoxicity
in: "Natural cell-mediated immunity
against tumors"
ed. R.B. Herberman, Academic Press,
New York, 1309

28. Herberman, R.B.
(1982) "NK Cells and Other Natural Effector
Cells"
Academic Press, New York

29. Herberman, R.B.
(1986) Natural Killer Cells
Ann. Rev. Med. 37, 347

30. Herberman, R.B.
(1986) Effects of biological response modi-
fiers on effector cells with cytotoxic
activity against tumors
Seminars in Oncology 13, 195

31. Herberman, R.B.
Ortaldo, J.R.
(1981) Natural killer cells: their role in
defenses against disease
Science 214, 24

32. Higgins, D.A.
(1981) Markers for T and B lymphocytes and
their application to animals
Vet. Bull. 51, 925

33. Hiroaki, N.
Saijo, N.
Hyoj, M.
Fujita, J.
Sasaki, Y.
Shimizu, E.
Kanzawa, F.
Inomata, M.
Hoshi, A.
(1985) Detection of NK activity and ADCC of
lymphocytes by human tumor clonogenic
assay - its correlation with the ⁵¹Cr-
release assay
Int. J. Cancer 35, 449

34. Horwitz, D.A.
Bakke, A.C.
Abo, W.
Nishiya, K.
(1984) Monocyte and NK cell cytotoxic activi-
ty in human adherent cell prepara-
tions: discriminating effects of
interferon and lactoferrin
J. Immunol. 132, 2370

35. Hoshino, T.
Koren, H.S.
Uchida, A.
(1984) "Natural killer cell activity and its
regulation"
Excerpta Medica, Amsterdam

36. Julius, M.H.
Simpson, E.
Herzenberg, L.A.
(1973) A rapid method for the isolation of
functional thymus-derived murine
lymphocytes
Eur. J. Immunol. 3, 645

37. Kaplan, J. (1986) NK cell lineage and target specificity: - A unifying concept
Immunol. Today 7, 10
38. Kaplow, L.S. (1965) Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride
Blood 26, 215
39. Kasair, M. Iwamori, M. Nagai, Y. Okumura, K. Tada, T. (1980) A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells
Eur. J. Immunol. 10, 175
40. Kasza, L. (1964) Establishment and characterization of canine thyroid adenocarcinoma and canine melanoma cell lines
Am. J. Vet. Res. 25, 1178
41. Kay, H.D. Klassen, L.W. (1986) Peripheral blood granulocytes as effectors of regulation for the human NK cell system
Nat. Immun. Cell Growth Regul. 5, 1
42. Kay, R.G. Sharpin, R.K. Brown, K.J. Voegtli, U. (1973) A method for the isolation of lymphocytes from dog blood
Transplant. 16, 250
43. Keller, R. (1983) Characteristics of cytotoxic macrophages as natural effectors of resistance to cancer
in: "Clinics in Immunology and Allergy - Natural Mechanisms of Immunity" ed. R.B. Herberman, W.B. Saunders Company LTD, London, 523
44. Kiessling, R. Klein, E. Wigzell, H. (1975) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype
Eur. J. Immunol. 5, 112
45. Kiyohara, T. Lauzon, R. Haliotis, T. Roder, J.C. (1986) Target cell structures, recognition sites, and the mechanism of NK cytotoxicity
in: "Immunobiology of Natural Killer Cells", Volume I ed. E. Lotzova, R.B. Herberman, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 107

56. Lotzova, E.
Savary, Ch. A.
(1986) Regulation of NK cell activity by suppressor cells
in: "Immunobiology of Natural Killer Cells", Volume II
ed. E. Lotzova, R. B. Herberman, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 163
57. Loughran, T. P., Jr.
Deeg, H. J.
Storb, R.
(1985) Morphologic and phenotypic analysis of canine natural killer cells: evidence for T-cell lineage
Cell. Immunol. 95, 207
58. MacEwen, E. G.
(1985) Approaches to cancer therapy using biological response modifiers
in: "Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice"
Vol. 15, Symposium on Clinical Veterinary Oncology, 667
59. Magnuson, N. S.
Perryman, L. E.
Wyatt, C. R.
Mason, P. H.
(1985) Studies of lymphocytes with natural killer cell morphology from horses with hereditary severe combined immunodeficiency (SCID)
Fed. Proc. 44, 594
60. Maier, T.
Holda, J. H.
Claman, H. N.
(1986) Natural suppressor (NS) cells
Immunol. Today 7, 312
61. Mandeville, R.
Sombo, F. - M.
Rocheleau, N.
(1983) Natural cell-mediated cytotoxicity in normal human peripheral blood lymphocytes and its in vitro boosting with BCG
Canc. Immunol. Immunoth. 15, 17
62. Mantovani, A.
Jerrells, T. R.
Dean, J. H.
Herberman, R. B.
(1979) Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes
Int. J. Cancer 23, 18
63. Mayr, A.
(1979) Entwicklung neuer Immunisierungs- und Paramunisierungsverfahren in der Tiermedizin
Blaue Hefte 60, 494
64. Mayr, A.
(1981) Induction of paramunity
in: "Biological products for viral diseases", ed. P. A. Bachmann,
Taylor and Francis LTD., London, 201

65. Mayr, A.
(1982) Wissenschaftliche Entwicklung auf dem Gebiet der medikamentösen Steigerung der nichtantigenspezifischen, körpereigenen Abwehr
Prakt.Tierarzt 63, 329
66. Mayr, A.
(1982) Paramunität und Paramunisierung
Zbl.Vet.Med. 29, 5
67. Mayr, A.
(1986) Fortschritte bei der Immunisierung und Paramunisierung von Nutztieren
Prakt.Tierarzt 67, 865
68. Mayr, A.
 Bachmann, P.A.
 Bibrack, B.
 Wittmann, G.
(1978) "Virologische Arbeitsmethoden I/II"
Fischer Verlag, Stuttgart
69. Mayr, A.
 Raettig, H.
 Sticke, H.
 Alexander, M.
(1979) Paramunität, Paramunisierung, Paramunitätsinducer
Teil I und II
Fortschr.Med. 97, 1159, 1205
70. Mayr, A.
 Büttner, M.
(1984) Neue Erkenntnisse über die Grundlagen der Paramunität und Paramunisierung
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 97, 429
71. Mayr, A.
 Büttner, M.
 Pawlas, S.
 Erfle, V.
 Mayr, B.
 Brunner, R.
 Osterkorn, K.
(1986) Vergleichende Untersuchungen über die immunstimulierende (paramunisierende) Wirksamkeit von BCG, Levamisol, Corynebacterium parvum und Präparaten aus Pockenviren in verschiedenen "in vivo"- und "in vitro"-Testen
J.Vet.Med. 33, 321
72. McGinnes, K.
 Chapman, G.
 Marks, R.
 Penny, R.
(1986) A fluorescence assay using flow cytometry
J.Immunol.Meth. 86, 7
73. Nagao, S.-J.
 Sato, K.
 Osada, Y.
(1986) Synergistic induction of cytotoxicity in macrophages by murine gamma-IFN and biological response modifiers derived from microorganisms
Canc.Immunol.Immunoth. 23, 41
74. Osbaldiston, G.W.
 Sullivan, R.J.
 Fox, A.
(1978) Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes
Am.J.Vet.Res. 39, 683

75. Ortaldo, J.R.
(1986) Role of TNF in NK cell-mediated cytotoxicity
in: "Fourth International Workshop on Natural Killer Cells"
Nat.Immun.Cell Growth Regul. 5, 127
76. Ortaldo, J.R.
Sharrow, S.O.
Timonen, T.
Herberman, R.B.
(1981) Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies
J.Immunol. 127, 2401
77. Ortaldo, J.R.
Herberman, R.B.
(1984) Heterogeneity of natural killer cells
Ann.Rev.Immunol. 2, 359
78. Ortaldo, J.R.
Ransom, J.R.
Sayers, T.J.
Herberman, R.B.
(1986) Analysis of cytostatic/cytotoxic lymphokines: relationship of natural killer cytotoxic factor to recombinant Lymphotoxin, recombinant Tumor necrosis factor, and Leukoregulin
J.Immunol. 137, 2857
79. Ortaldo, J.R.
Mason, L.H.
Mathieson, B.J.
Liang, S.-M.
Flick, D.A.
Herberman, R.B.
(1986) Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumor necrosis factor
Nature 321, 700
80. Peters, P.M.
Ortaldo, J.R.
Shalaby, M.R.
Svedersky, L.P.
Nedwin, G.E.
Bringman, T.S.
Hass, P.E.
Aggarwal, B.B.
Herberman, R.B.
Goeddel, D.V.
Palladino, M.A., Jr.
(1986) Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF- α but not TNF- β (Lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes
J.Immunol. 137, 2592
81. Philip, R.
Epstein, L.B.
(1986) Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin 1
Nature 323, 86

82. Pollack, S.B.
(1983) In vivo functions of natural killer cells
in: "Survey and Synthesis of Pathology Research 2"
Ed.-in-Chief J.M.Cruse,
Jackson, Miss., 93
83. Ringler, S.
Krakowka, St.
(1985) Effects of canine distemper virus on
natural killer cell activity in dogs
Am.J.Vet.Res. 46, 1781
84. Ringler, S.
Krakowka, St.
(1985) Cell surface markers of the canine
natural killer cell
Vet.Immunol.Immunopath. 9, 1
85. Roitt, I.
Brostoff, J.
Male, D.
(1985) "Immunology"
Yower Medical Publishing, London
86. Rolle, M.
Mayr, A.
(1984) "Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre"
5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag,
Stuttgart
87. Savary, Ch.A.
Lotzova, E.
(1986) Phylogeny and ontogeny of NK cells
in: "Immunobiology of Natural Killer
Cells", Volume I
ed. E.Lotzova, R.B.Herberman, CRC
Press Inc., Boca Raton, Florida, 45
88. Sayers, T.J.
Ransom, J.H.
Denn III, A.C.
Herberman, R.B.
Ortaldo, J.R.
(1986) Analysis of a cytostatic lymphokine
produced by incubation of lymphocytes
with tumor cells: relationship to
Leukoregulin and distinction from re-
combinant Lymphotoxin, recombinant
Tumor necrosis factor, and Natural
killer cytotoxic factor
J.Immunol. 137, 385
89. Scala, G.
Djeu, J.Y.
Allavena, P.
Kasahara, T.
Ortaldo, J.R.
Herberman, R.B.
Oppenheim, J.J.
(1986) Cytokine secretion and non-cytotoxic
functions of human large granular
lymphocytes
in: "Immunobiology of Natural Killer
Cells", Volume II
ed. E.Lotzova, R.B.Herberman, CRC
Press Inc., Boca Raton, Florida, 133
90. Schalm, O.W.
Jain, N.C.
Caroll, E.J.
(1975) "Veterinary Hematology"
3rd Edition, Lea & Febiger,
Philadelphia

91. Shalaby, M.R.
Pennica, D.
Palladino, M.A., Jr.
(1986) An overview of the history and biologic properties of tumor necrosis factors
Springer Semin. Immunopath. 9, 33
92. Shau, H.
Golub, S.H.
(1985) Depletion of NK cells with the lysosomotropic agent L-Leucine Methyl Ester and the in vitro generation of NK activity from NK precursor cells
J. Immunol. 134, 1136
93. Shaw, S.E.
Anderson, N.V.
(1984) Isolation and functional analysis of normal canine blood monocytes and resident alveolar macrophages
Am. J. Vet. Res. 45, 87
94. Shek, W.R.
Schultz, R.D.
Appel, M.J.G.
(1980) Natural and immune cytolysis of canine distemper virus-infected target cells
Infect. Immun. 28, 724
95. Skinner, M.A.
Finberg, R.W.
Ertl, H.C.J.
(1986) Regulation of cytotoxic lymphocyte precursors
Cell. Immunol. 100, 239
96. Somers, S.D.
Johnson, W.J.
Adams, D.O.
(1986) Destruction of tumor cells by macrophages: mechanisms of recognition and lysis and their regulation
in: "Cancer Immunology: Innovative Approaches to Therapy"
ed. R.B. Herberman, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 69
97. Stutman, O.
Figarella, E.F.
Paige, C.J.
Lattime, E.C.
(1980) Natural cytotoxic (NC) cells against solid tumors in mice: general characteristics and comparison to natural killer (NK) cells
in: "Natural Cell-Mediated Immunity Against Tumors"
ed. R.B. Herberman,
Academic Press, New York, 187
98. Tham, K.M.
Studdert, M.J.
(1985) Nylon wool column fractionation and characterisation of feline lymphocyte subpopulations
Vet. Immunol. Immunopath. 8, 3
99. Timonen, T.
Saksela, E.
Ranki, A.
Häyry, P.
(1979) Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets
Cell. Immunol. 48, 133

100. Timonen, T.
Saksela, E.
(1980) Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation
J.Immunol.Meth. 36, 285
101. Timonen, T.
Ortaldo, J.R.
Herberman, R.B.
(1981) Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cell
J.Exp.Med. 153, 569
102. Tompkins, M.B.
Huber, K.
Tompkins, W.A.F.
(1983) Natural cell-mediated cytotoxicity in the domestic cat
Am.J.Vet.Res. 44, 1525
103. Urban, J.L.
Shepard, A.M.
Rothstein, J.C.
Sugarman, B.J.
Schreiber, H.
(1986) Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages
Proc.Natl.Acad.Sci. 83, 5233
104. VanKessel, K.P.M.
Vissier, M.R.
VanStrijp, J.A.G.
VanKats-Renaud, J.H.
Verhoef, J.
(1986) Cytotoxicity by human adherent cells-oxygen-dependent and oxygen-independent cytotoxic reactions by different cell populations
Immunol. 58, 291
105. Weiss, S.J.
Slivka, A.
(1982) Monocyte and granulocyte-mediated tumor-cell destruction. A role for the hydrogen peroxide-myeloperoxidase-chloride system
J.Clin.Invest. 69, 255
106. Welsh, R.M.
(1986) Regulation of virus infections by natural killer cells
Nat.Immun.Cell Growth Regul. 5, 169
107. Whitacre, C.C.
Lang, R.W.
(1975) A technique for separation of canine lymphocytes and their use in the lymphocytotoxic, blastogenic and rosette assays
Transfusion 15, 346
108. Wilson, D.B.
(1965) Quantitative studies on the behaviour of sensitized lymphocytes in vitro. I.Relationship of the degree of destruction of homologous target cells to the number of lymphocytes and to the time of contact in culture and consideration of the effect of iso-immune serum
J.Exp.Med. 122, 143

109. Wright, S.C. Studies on the mechanism of natural
Weitzen, M.L. killer cytotoxicity. II. Coculture of
Kahle, R. human PBL with NK-sensitive or re-
Granger, G.H. sistant cell lines stimulates release
Bonavida, B. of natural killer cytotoxic factors
(1983) (NKCF) selectively cytotoxic to NK-
 sensitive target cells
 J.Immunol. 130, 2479
110. Yam, L.T. Cytochemical identification of mono-
Li, C.Y. cytes and granulocytes
Crosby, W.H. Am.J.Clin.Path. 55, 283
(1971)
111. Yamamoto, R.S. Role of lymphotoxins in natural cyto-
Weitzen, M.L. toxicity
Miner, K.M. in: "NK Cells and Other Natural
Devlin, J.J. Effector Cells"
Granger, G.A. ed. R.B.Herberman,
(1982) Academic Press, New York, 969
112. Young, H. Expression of asialo GM 1 and other
Yogeeswaran, G. antigens and glycolipids on natural
Burowki, J.F. killer cells and spleen leukocytes
Welsh, R.M. in virus-infected mice
(1985) Nat.Immun.Cell Growth Regul. 4, 21
113. Young, J.D.-E. The ninth component of complement and
Cohn, Z.A. the pore-forming protein (Perforin 1)
Podack, E.R. from cytotoxic T cells: Structural,
(1986) immunological, and functional simi-
 larities
 Science 233, 184
114. Young, W.W. Identification of ganglio-N-tetra-
Hakomori, S.I. osylceramide as a new surface marker
Durdik, J.M. for murine natural killer (NK) cells
Henney, C.S. J.Immunol. 124, 199
(1980)
115. Zalman, L.S. Mechanisms of cytotoxicity of human
Brothers, M.A. large granular lymphocytes: relation-
Chin, F.J. ship of the cytotoxic lymphocyte pro-
Müller-Eberhard, H. tein to the ninth component (C9) of
(1986) human complement
 Proc.Natl.Acad.Sci. 83, 5262
116. Zander, A.R. Surface markers on canine lympho-
Boopalam, N. cytes
Epstein, R.B. Transplant. 7, 724
(1975)

117. Zhang, S.-R. Augmentation of NK activity and/or
Salup, R.P. macrophage-mediated cytotoxicity in
Krias, P.E. the liver by biological response mo-
Twilley, T.A. difiers including human recombinant
Talmadge, J.E. interleukin 2
Herberman, R.B. Canc.Immunol.Immunoth. 21, 19
Wiltrout, R.H.
(1986)
118. Ziegler-Heitbrock, Tumor necrosis factor as effector
H.W.L. molecule in monocyte mediated cyto-
Möller, A. toxicity
Linke, R.P. Canc.Res. 46, 5947
Haas, J.G.
Rieber, E.P.
Riethmüller, G.
(1986)

8. ABRÜZUNGSVERZEICHNIS

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
BCGF	B cell growth factor
BRM	Biological response modifier
C3	3. Komplementkomponente
⁵¹ Cr-Test	Chromium 51-Freisetzungstest
CSF	Colony stimulating factor
CTAC	Canine thyreoid adenocarcinoma
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
FKS	Fötales Kälberserum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LAF	Lymphocyte activating factor
LGL	Large granular lymphocyte
LPS	Lipopolysaccharid
LRG	Leukoregulin
LT	Lymphotoxin
MAF	Macrophage activation factor
MDP	Muramyldipeptid
MHC	Major histocompatibility complex
MR	Maximum release
NKCF	Natural killer cytotoxic factor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphate buffered saline

SCMC	Spontaneous cell-mediated cytotoxicity
SR	Spontaneous release
TNF	Tumor necrosis factor

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die wertvollen Hinweise bei der Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Mathias Büttner für seine jederzeit gewährte Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit. Seiner technischen Assistentin Frl. Andrea Aigner spreche ich meinen Dank aus für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Assistenz bei der Arbeit im Labor.

Herrn Prof. Dr. Steven Krakowka vom College of Veterinary Medicine in Columbus, Ohio danke ich für die Überlassung der Zielzellen.

Bei Frau Prof. Dr. U. Matis aus der Chirurgischen Tierklinik der Universität München bedanke ich mich herzlichst für ihr Entgegenkommen bei der Beschaffung der benötigten Tumorzelllinien aus den U.S.A. sowie für die Erlaubnis zur Blutentnahme bei Hunden.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Lösslein aus dem Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München-Neuherberg, für die allzeit tatkräftige Unterstützung bei der Beschaffung von Hundeblut.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Rüsse, der durch Bereitstellung eines Laborplatzes den Beginn der Arbeit ermöglichte.

LEBENS LAUF

- 1960 Am 13.Juni wurde ich als erste Tochter des
Tierarztes Dr. Karl Brömler und seiner Ehefrau
Gertrud geb. Stenger in Frontenhausen geboren.
- 1966 Volksschule Frontenhausen
- 1970 Gymnasium Dingolfing, neusprachlicher Zweig
- 1979 Abitur
- Studium der Tiermedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
- 1985 Tierärztliche Prüfung und Approbation als
Tierärztin
- Am 14.September Verehelichung mit dem Medi-
zinstudenten Gunther Boenisch.
- 1986 Seit Januar Anfertigung der vorliegenden
Dissertation am Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität
München.

